

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1929-1930

N°

LES MÉTHODES OPTIQUES DE MESURE
ET LES TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION COLLOIDALE
APPLIQUÉES A L'ANALYSE BIOLOGIQUE
ET A L'EXPLORATION CLINIQUE

ÉTUDES ET TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION DES CONSTITUANTS DES LIQUIDES BIOLOGIQUES EN VUE DE LEUR DOSAGE OPACIMÉTRIQUE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE ET PHOTOMÉTRIE

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE

Pharmacien supérieur de l'Université de Paris

présentée et soutenue le 1930

PAR

TAILLANDIER (D^r M.)

Pharmacien de l'Université de Paris

Licencié ès sciences

Ancien élève de l'Institut Pasteur

Lauréat de l'École de Médecine et de Pharmacie de Rennes

Ex-interne en médecine

JURY

MM. J. BOUGAULT, *Président.*

E. TASSILLY, *Professeur.*

R. FABRE, *Agrégé.*

ÉDITIONS MÉDICALES NORBERT MALOINE

27, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 27

PARIS, 1930

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1929-1930

N°

LES MÉTHODES OPTIQUES DE MESURE
ET LES TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION COLLOIDALE
APPLIQUÉES A L'ANALYSE BIOLOGIQUE
ET A L'EXPLORATION CLINIQUE

ÉTUDES ET TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION DES CONSTITUANTS DES LIQUIDES BIOLOGIQUES EN VUE DE LEUR DOSAGE OPACIMÉTRIQUE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE ET PHOTOMÉTRIE

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE

Pharmacien supérieur de l'Université de Paris

présentée et soutenue le

1930

PAR

TAILLANDIER (D^r M.)

Pharmacien de l'Université de Paris

Licencié ès sciences

Ancien élève de l'Institut Pasteur

Lauréat de l'École de Médecine et de Pharmacie de Rennes

Ex-interne en médecine

JURY

{ MM. J. BOUGAULT, *Président.*
E. TASSILLY, *Professeur.*
R. FABRE, *Agrégé.*

ÉDITIONS MÉDICALES NORBERT MALOINE
27, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 27

..... PARIS, 1930

Personnel de la Faculté de Pharmacie

ADMINISTRATION

MM. RADAIS, *Doyen*, O. ✱, ☉ I.
PERROT, *Assesseur*, O. ✱, ☉ I.
G. DURSANT, *Secrétaire*, ✱, ☉ I.

PROFESSEURS

MM. RADAIS, O. ✱, ☉ I.	Cryptogamie et Microbiologie.
BÉHAL, Membre de l'Institut, G. O. ✱, ☉ I.	Chimie organique.
PERROT, O. ✱, ☉ I.	Histoire naturelle des médicaments.
COUTIERE, O. ✱, ☉ I.	Zoologie.
GRIMBERT, ✱, ☉ I.	Chimie biologique.
LEBEAU, O. ✱, ☉ I.	Pharmacie chimique.
DELEPINE, Membre de l'Institut, O. ✱, ☉ I.	Hydrologie et Hygiène.
GUERBET, ✱, ☉ I.	Toxicologie.
BOUGAULT, ✱, ☉ I.	Chimie analytique.
GORIS, ✱, ☉ I.	Pharmacie galénique.
GUÉRIN, ✱, ☉ I.	Botanique générale.
TASSILLY, ✱, ☉ I.	Physique.
DAMIENS, ✱, ☉ I.	Chimie minérale.

Professeur honoraire : M. A. VILLIERS, ✱, ☉ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. SOMMELET, ✱, ☉ I.	Minéralogie.
MARC HONNORAT, ✱, ☉ I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LUTZ, ✱, ☉ I.	Cryptogamie.
LAUNOY, ✱, ☉ I.	Pharmacodynamie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. SOMMELET, ✱, ☉ I.	MM. PICON, ☉ I.
LUTZ, ✱, ☉ I.	FABRE, ☉ A.
LAUNOY, O. ✱, ☉ A.	MASCRÉ, ☉ I.
HÉRISSEY, O. ✱, ☉ I.	FLEURY, ☉ I.
DELABY, ✱, ☉ A.	BACH, ☉ I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. FABRE, ☉ A. et FLEURY, ☉ I. *agregés*,
chargés des travaux de Chimie analytique.

SOUÈGES, ☉ I.	Micrographie.
LEROUX, ☉ I.	Physique.
DEVAL, ☉ I.	Microbiologie.
HÉRISSEY, O. ✱, ☉ I., DELABY, ✱, ☉ A., et PICON, ☉ I. :	

agregés, chargés des travaux généraux de 4^e année.

Bibliothécaire en Chef : M. BEAULIEUX, ☉ I.



A mes maîtres :

MONSIEUR J. BOUGAULT

Professeur de Chimie analytique
à la Faculté de Pharmacie de Paris

*Qui nous a encouragé, guidé dans
ce travail et a bien voulu accepter de
présider notre thèse.*

MONSIEUR CH. LENORMAND

Professeur de Chimie analytique à l'Ecole
de Médecine et de Pharmacie de Rennes

*A ceux qui m'ont aidé à mener à bien
ce travail et ont accepté de le juger
dans notre jury de thèse :*

MONSIEUR E. TASSILLY

Professeur de Physique à la Faculté de Pharmacie de Paris

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ R. FABRE

A ceux qui m'ont instruit à l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Rennes, à la Faculté des Sciences de Rennes, à la Faculté de Pharmacie de Paris et à la Faculté des Sciences de Paris, dans les Hôpitaux et les Laboratoires cliniques.

ÉTUDES ET TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION DES CONSTITUANTS DES LIQUIDES BIOLOGIQUES EN VUE DE LEUR DOSAGE OPACIMÉTRIQUE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE ET PHOTOMÉTRIE

Introduction

Une méthode pour mesurer facilement et exactement un précipité autrement qu'avec une balance, a depuis longtemps préoccupé l'esprit de recherche d'un certain nombre de physiciens, de chimistes et de biochimistes.

On conçoit facilement que des volumes de plus en plus considérables d'un élément insolubilisé, pesant de plus en plus, offriront une surface de plus en plus absorbante pour un faisceau lumineux ; mais la réalisation pratique d'une telle méthode de mesure, qui soit susceptible de donner le même résultat que la pesée, trouve des obstacles que les chercheurs ont dû renverser un à un. Les techniques modernes de micro-analyses où le précipité d'un élément pris à l'état de trace est infime, et nécessite des appareils coûteux pour sa pesée (micro-balance), et des techniques délicates où les causes d'erreur ne manquent pas, ont de nos jours donné plus d'intérêt à cette question. Cependant, le problème n'est pas si simple qu'il le paraît à première vue ; ce qui fait que ceux qui ne se plient pas ou plutôt méconnaissent les principes fondamentaux d'une telle méthode de mesure, n'arrivent qu'à des résultats insuffisants. Nous montrerons que trois groupes de faits venus à des dates différentes éclairent ces méthodes et les placent dans le domaine de l'exactitude et de la précision scientifique, et dans le domaine pratique :

1° La mise en évidence par des savants tels que lord RAYLEIGH et, de nos jours, MM. CHÉNEVEAU et AUDUBERT, VLÈS, KLEIN-

MANN, des principes régissant des propriétés d'absorption et de diffusion des grains d'un précipité, ou si l'on veut d'un flocculum, vis-à-vis d'un faisceau lumineux ;

2^o La réalisation d'appareils basés sur ces principes : les spectro-photomètres et photomètres à faisceaux lumineux monochromatiques, appareils que l'on rencontre de plus en plus dans les laboratoires d'analyses cliniques, de chimie analytique, d'expertises ;

3^o L'utilisation préconisée dans ce travail des lois et principes relatifs à la stabilité et à l'homogénéité des suspensions à grains fins, des émulsions, ou des colloïdes vrais, en vue d'obtenir des préparations adéquates aux méthodes de mesures optiques.

Ayant eu souvent en tête ces divers éléments pendant les nombreuses et longues précipitations et pesées que nous avons pu faire pendant nos études, et au Laboratoire de Chimie générale de l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Rennes, nous avons entrepris, il y a plus de trois ans, l'application de ces éléments et principes au dosage par précipitation colloïdale, des principes immédiats utiles à doser pour la biochimie et la clinique médicale, dans les liquides biologiques. Poursuivant notre travail sur les techniques préconisées dans cet ouvrage, nous publierons ultérieurement une étude sur la séparation et la précipitation électives des albumines des liquides biologiques en vue de leur dosage par opacimétrie avec les appareils de précision scientifiques cités : « Le sujet est vaste et intéressant ; en dehors des services très nombreux, écrivent MM. CHÉNEVEAU et AUDUBERT (1), qu'une méthode de ce genre pourrait rendre, appliquée aux dosages chimiques, nous pensons qu'elle aurait encore un intérêt dans certaines questions spéculatives du domaine physicochimique ; elles permettraient de résoudre un certain nombre de problèmes concernant le processus de formation de précipités et leur vitesse de réaction. »

Les premiers résultats du présent travail ont été publiés au cours des années 1927-1928 ; nous avons exposé nous-mêmes à la Société de Biologie de Paris les premiers résultats analytiques obtenus en utilisant le photomètre VERNES, BRICO, YVON, que M. le Dr BODIN, Professeur de Bactériologie et Sérologie à l'Ecole de

1. CHÉNEVEAU et AUDUBERT, *Ann. de Physique*, 1920, 13, 159.

Médecine de Rennes avait mis à notre disposition, quand nous étions préparateur de Chimie à Rennes ; nous avons publié (1) les premiers résultats en collaboration avec M. D. LEROY qui avait fait avec nous-mêmes des lectures photométriques sur l'appareil employé. En 1927, à la Société de Pharmacie de Paris, M. J. BOUGAULT a exposé, pour nous-mêmes, une note sur les résultats obtenus avec l'urine (2) ; nous le prions d'agréer nos remerciements renouvelés ici.

Poursuivant méthodiquement notre travail nous avons au cours d'expériences et d'essais nombreux été amené à mettre à profit les observations faites chaque jour au laboratoire, et à apporter des modifications dans les techniques premières ; nous exposerons l'ensemble de ces travaux (3).

Ce travail constitué par des observations, des travaux et des résultats faits et obtenus au laboratoire avec, comme guides, les grands principes que nous avons énoncés au début, comprendra :

CHAPITRE PREMIER. — Exposé historique des méthodes et appareils divers pour la mesure optique des milieux troubles.

CHAPITRE II. — Etude des lois et principes qui régissent l'action de la lumière sur un milieu trouble. Mise en œuvre de ces principes à la construction pratique d'appareils optiques de mesure.

CHAPITRE III. — Exposé et étude des techniques de précipitation colloïdale, des propriétés des suspensions et émulsions en vue d'obtenir des préparations pour mesures photométriques et spectrophotométriques.

CHAPITRE IV. — Recherches expérimentales sur les techniques de précipitation à grains fins ; mise au point de ces méthodes pour les dosages et microdosages des chlorures, acide urique, sucre réducteur, acétone, phosphate, urée, calcium, contenus dans les liquides biologiques,

1. TAILLANDIER (M.) et LEROY, *C. R. Soc. Biol.*, 1927, 27, p. 557 et 706.

2. TAILLANDIER (M.), *Technique de précipitation colloïdale en vue des microdosages optiques au photomètre* (*Journ. Pharm. et Chim.*, 1927, 8^e série, 6, 465).

3. Nous adressons l'expression de nos vifs remerciements à tous ceux qui nous ont facilité et rendu possible nos recherches aux laboratoires de Chimie analytique et de Physique de la Faculté de Pharmacie de Paris, et aux laboratoires de sérologie de l'Institut Prophylactique de la ville de Paris.

sérum, plasma, urines, liquide céphalo-rachidien, liquide d'épanchement (ascite, liquide de plèvre et d'hydrocèle, etc...).

CHAPITRE V. — Exposé des techniques préconisées, résultats, comparaisons avec les méthodes volumétriques et gravimétriques.

Nous prions M. le Professeur BOUGAULT, M. le Professeur TASSILLY et M. le Professeur agrégé R. FABRE d'agréer le désir que nous avons eu de mener à bien ce travail et d'en faire une œuvre utile, tant au point de vue scientifique que pratique, comme faible gage de notre reconnaissance.

Chapitre I

EXPOSÉ HISTORIQUE DES MÉTHODES DE MESURE OPTIQUE DES MILIEUX TROUBLES

L'exposé historique des méthodes de mesure optique des milieux troubles, se résume comme pour toute méthode scientifique de mesure à enregistrer les stades parcourus, depuis l'idée intuitive de l'action de tels milieux sur un faisceau lumineux (dont il est question à l'introduction de cet ouvrage), et à en dégager les apports nouveaux, tant dans nos connaissances scientifiques sur la question, que dans l'appareillage pratique.

L'idée qu'un milieu opaque, absorbe plus ou moins la lumière suivant son opacité, ou exerce des actions diverses suivant sa constitution et sa texture, semble avoir été pensé et utilisé de tous temps. On trouve des allusions à ce principe fondamental des mesures optiques chez les auteurs anciens, dans les travaux d'EUCLIDE (300 ans av. J.-C.), de PTOLÉMÉE d'Alexandrie; dans les travaux de ROEMER en France et de BRADLEY en Angleterre, au ^{xvii}^e siècle, sur la vitesse de la lumière; de NEWTON en 1670, et de FRAUNHOFER sur la dispersion. Dans les écrits et les relations sur la vie des peuples anciens, en langues anciennes ou traduites par les auteurs du ^{xvi}^e et surtout du ^{xvii}^e siècle (1), on y voit signalées les méthodes d'appréciation de la valeur des eaux,

1. On sait que les Phéniciens sont considérés comme les inventeurs du verre, dont ils possédaient plusieurs variétés classées d'après leur transparence; des détails intéressants nous ont été donnés à ce sujet par notre ami M. R. GRIMAUT, Ing. des Arts et Man. Quelques conférences de M. VIGREUX sont fort intéressantes sur ce sujet (Conférences à la Sorbonne, Paris).

des vins, des boissons, des breuvages divers, suivant leur transparence. La vieille médecine utilisait naturellement aussi, puisque essentiellement empirique, l'aspect plus ou moins trouble des humeurs de l'organisme (liquides d'épanchement, urines), l'aspect du sang, l'aspect et le degré de trouble du sérum après coagulation ; il suffit à ce sujet de lire les « écrits sur la médecine » de GUY PATIN et François GUÉNAULT de 1615 à 1630 ; Jean RIOLAN le fils (1) de Guy de CHAULIAC (2), des médecins de l'Université belge de Louvain, Verale et Rega.

L'idée prend corps avec les travaux de DONNÉ, en 1834, qui construit un appareil pour apprécier la valeur du lait par absorption d'un faisceau lumineux, dirigé sur un récipient plein du lait à examiner. Notons qu'à ce moment, on n'envisage point les phénomènes et actions complexes qui peuvent se produire dans un milieu trouble traversé par un faisceau lumineux (absorption, diffusion, réfraction, réflexion, polarisation), seule l'absorption, l'arrêt plus ou moins considérable de lumière, est considéré.

Dans l'appareil de DONNÉ, la source était une bougie, placée près d'un vase transparent ; l'expérimentateur appréciait la lumière transmise par une petite fenêtre pratiquée dans un écran placé derrière le récipient ; il exprimait le résultat en richesse en beurre.

A partir de 1893, paraissent des travaux plus considérables d'AGLOT (3) qui cherche à dégager les principes de cette méthode et l'applique au dosage de nombreux éléments de dosages courants et utiles ; il construisit un appareil assez peu différent de celui de DONNÉ et dont il existe un cliché dans le *Précis de Chimie analytique* de M. G. DENIGÈS (4) ; il comprenait un cylindre fermé par une glace à faces plates, surmonté d'une cuvette concentrique de plus grand diamètre, laquelle était obturée par un plateau qui s'y trouve vissé. Le plateau porte en son centre un manchon dans lequel glisse à frottement doux un tube T évasé à sa partie supérieure et fermé en bas par une glace à faces planes ; ce tube est mis en mouvement par une vis à crémaillère, un vernier donne la distance entre les 2 glaces, c'est-à-dire l'épaisseur

1. Les écrits de ces premiers médecins sont à la Faculté de Médecine de Paris. On peut aussi remarquer leur portrait dans différentes salles de la Faculté.

2. Faculté de Montpellier (XIV^e siècle).

3. AGLOT, *Marseille*. Imprimerie marseillaise, 1893-1894-1895.

4. DENIGÈS, *Précis de Chimie analytique*, p. 376, 5^e éd.

liquide dont on mesure l'opalescence et sur laquelle est dirigée une flamme de bougie.

Il applique cet appareil au dosage des corps suivants :

Beurre, albumine, sels de plomb, de mercure et d'antimoine.

Cependant, lord RAYLEIGH fait une étude scientifique et rationnelle de l'influence des milieux troubles sur la lumière et publie, à partir de 1871 (1), le résultat de ses travaux. Il énonce les lois de l'absorption et de la diffusion de la lumière par des particules très fines en suspension dans un milieu donné ; il montre l'influence du diamètre du nombre des particules dans l'unité de volume, de la longueur d'onde de la lumière incidente et d'un coefficient qui dépend des propriétés optiques de la particule et du milieu interparticulaire (réfraction).

L'exposé de ces lois et leur portée pratique sera fait dans un chapitre spécial.

Les chercheurs qui ont suivi lord RAYLEIGH dans sa voie se sont tous éclairés de ses travaux ; CROVA, d'abord en 1890 (2), essaie de vérifier sur l'atmosphère même la loi fondamentale de lord RAYLEIGH, puis ABNEY étudie à sa lumière les émulsions de mastic. HURION (3) la vérifie sur de très fins précipités de chlorure d'argent ; puis BOUTARIC (4), qui en tire des conclusions intéressantes exposées plus loin. Citons ici encore les travaux de BLOCH et RENWICK sur l'opacité des émulsions de sels d'argent pour plaques photographiques (5).

PERTNER en 1901 (6), puis EHRENSHAFT en 1904 (7) l'appliquent expérimentalement aux solutions colloïdales vraies (8). A ce sujet, certains ont essayé d'appliquer le principe d'observation de la lumière diffusée par les particules en suspension, c'est ce qu'a fait TSWETT (9) mettant ainsi la mesure opacimétrique en relation avec le phénomène de TYNDALL, de même KHUN-WHOITHE et SHÉP-

1. Lord RAYLEIGH, *Phil. Mag.*, février 1871 et 1899 (5), 43, 375.

2. CROVA, *Ann. de Chimie Phys.*, 6^e s., t. 20, 1890, p. 480 et t. XXV, 1892.

3. HURION, *C. R. A. S.*, t. 152, 1891, p. 1431.

4. BOUTARIC, thèse de doctorat. Paris, 1918.

5. BLOCH et RENWICK, *The Photographic Journal*, t. LVI, 1916, p. 49.

6. PERTNER, *Ac. Sc. Vienne*, t. LXXIII, 1901.

7. EHRENSHAFT, *Phys. Zeit.* (5), 1904, p. 387.

8. Il est indispensable de préciser quand on emploie le terme général de colloïdes, à quelle variété de colloïde on a affaire, ce travail sera fait ultérieurement en détail.

9. TSWETT, *Zeit. f. Physik Ch.*, v. 36, p. 4 et 450.

PART-ELLIOT. Des apports nouveaux ont été faits récemment à la loi de lord RAYLEIGH par KEEN et PORTNER (1) dans l'étude de l'absorption de la lumière par du soufre, précipité de l'hypo-sulfite de soude par un acide. [Les "propriétés absorbantes des solutions colloïdales et des suspensions homogènes à grains fins ont été bien mises en évidence par GARNETT (2) et exposées magistralement par E.-F. BURTON dans son ouvrage sur « The Physical Properties of Colloidal Solutions (3) », travaux à côté desquels il faut citer ceux de MIE (4), de STREUBING (5), de MUELLER (6).

Tout récemment des travaux d'un intérêt considérable sont venus s'ajouter aux principes de lord RAYLEIGH déjà augmentés de remarques de BOUTARIC et de KEEN et PORTNER, ce sont les travaux de MM. CHÉNEVEAU et AUDUBERT, ceux de M. VLÈS, enfin de KLEINMANN.

CHÉNEVEAU et AUDUBERT (7) ont montré que la formule de lord RAYLEIGH n'était valable que pour les milieux à particules très fines et trouvèrent une loi exponentielle, applicable aux suspensions à gros grains, de $1\ \mu$ à $120\ \mu$, reliant l'absorption et la masse totale du corps en suspension. M. VLÈS (8) a étudié l'absorption de la lumière par des suspensions de bactéries et a constaté que l'absorption ne correspondait pas à une loi exponentielle du type de celle de BEER, LAMBERT ou de CHÉNEVEAU et AUDUBERT ni à la loi de lord RAYLEIGH modifiée par BOUTARIC pour les grosses particules et il a déterminé une loi d'absorption représentée par une formule hyperbolique (9). Ces discussions seront exposées dans le chapitre sur les lois des mesures optiques. Tout dernièrement enfin, KLEINMANN qui a une longue expérience de ces questions, a remarqué une proportion directe entre les intensités lumineuses et la concentration des milieux troubles, à la condition expresse que la grandeur de ces particules soit la même, ce qui ramènerait l'opacimétrie aux principes de la colorimétrie ;

1. *Proc. Royal Society*, t. LXXXIX, 1914, p. 370.

2. GARNETT, *Phil. Trans. (A)* 203, 1904, p. 205 et 385, 1906, p. 237.

3. BURTON, *The Physical Properties of colloidal solutions*, 1916.

4. MIE, *Ann. der Physik*, 1908, v. 25, p. 155.

5. STREUBING, these Greiswald, 1908. *Propriétés optiques des colloïdes*.

6. MUELLER, *Ann. d. Physik*, 1907, v. 23, p. 1 ; *Bibliog. d. Kolloïde bis Zum Jahre*, 1904 ; *Allg. Chemie der Kolloïde*. Leipzig, 1907.

7. CHÉNEVEAU et AUDUBERT, *C. R. A. S.*, 1919 et 1920 ; *Ann. de Physique*, 1920, t. XIII, p. 134.

8 et 9. VLÈS, *C. R. A. S.*, t. CLXVIII, p. 575, 794, 797.

nous verrons plus loin que penser de cette dernière remarque.

A ces différents stades de l'optique des milieux troubles et aux travaux des savants qui ont fait avancer cette science, correspondent des artifices et appareils pour mettre pratiquement en œuvre les faits observés, dans un but analytique. Les appareils rudimentaires et empiriques de DONNÉ et d'AGLOT (1) sommairement décrits furent les premiers appareils utilisés pratiquement (2). En 1904, RICHARD et WELLS (2) étudiant le dosage par absorption et diffusion du chlorure d'argent construisirent le premier appa-

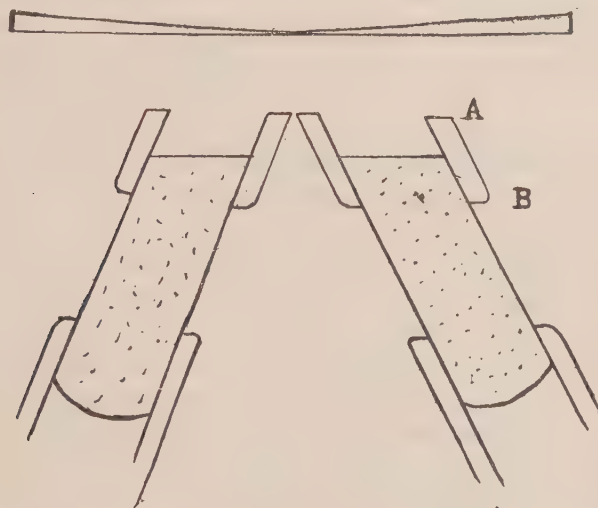


Fig. 1. — A B, Manchon mobile. Schéma de l'appareil RICHARD et WELLS, avec le tube étalon, le tube contenant la suspension à doser et le manchon mobile.

reil (fig. 1) réalisant une bonne égalité des termes de comparaison, mais surtout employé en mesure de diffusion ; cet appareil comprend un tube que l'on pouvait découvrir plus ou moins grâce à un manchon mobile jusqu'à l'obtention de l'égalité avec le tube étalon. Cet appareil cherche pratiquement à mettre en œuvre quelques remarques des savants qui ont étudié l'optique des milieux troubles et distingué les mesures optiques PAR DIFFUSION, CE QUI CRÉE LA DIFFUSIMÉTRIE, et les mesures PAR ABSORPTION DANS LES-

1. DONNÉ-AGLOT, *loc. cit.*

2. RICHARDS et WELLS, *Am. Chem. Journ.*, t. 35, p. 511.

QUELLES LA LUMIÈRE EST ABSORBÉE PAR LA SUSPENSION DES GRAINS PRÉCIPITÉS, CE QUI CONSTITUERA L'OPACIMÉTRIE OU DIAPHANOMÉTRIE, méthode qui deviendra correcte et scientifique par l'application des lois qui la régissent et d'un appareil adéquat.

Dans la suite, BLOOR (1) a modifié l'appareil de RICHARD et WELLS en utilisant des godets mobiles au lieu de manchons mobiles, puis le colorimètre de DUBOSCQ parut ; bien entendu, on y employa un étalon fait d'un liquide d'opacité définie, de même qu'on y emploie une couleur étalon ; on s'en sert encore en opacimétrie malgré la grossièreté des résultats qu'il donne.

On le modifia par les mesures d'absorption ; en 1912, KOBER (2) en particulier, enduit les manchons de laque noire, sauf le fond de ceux-ci, et il fixe à ces deux manchons deux échelles qui se meuvent avec eux, mais en dehors des godets : de cette façon, il écarte les sources d'erreur causées d'une part par les ménisques et d'autre part par la réflexion indirecte dans le fond des godets et sur leurs côtés, et par celles d'un godet à l'autre. DIÉNER (3) modifie aussi le colorimètre de DUBOSCQ en vue de l'utiliser comme néphélomètre et diffusimètre ; pour cela il prend comme source de lumière une lampe à projection placée au foyer d'un condensateur afin d'obtenir un faisceau parallèle. En fixant perpendiculairement à la direction des rayons lumineux qui traversent les liquides à comparer, un dispositif de prismes et la lunette du colorimètre, on compare les intensités de la lumière diffusée et diffractée par les particules solides des liquides à examiner.

Les Américains emploient divers types variés de ces modifications du colorimètre DUBOSCQ en remplaçant les godets ordinaires par des godets en verre transparent dont le fond est constitué d'un disque opaque noir en vue des mesures par diffusion.

En 1919, KLEINMANN réalise un bon appareil, modification du micro-photomètre de PESCHL, lui-même modification du colorimètre de DUBOSCQ ; cet appareil utilise la lumière diffusée par les particules solides du milieu à examiner et à une préparation opaque, servant de termes de comparaison ; il est assez voisin de l'appareil de DIÉNER.

1. BLOOR, *J. of biol. Chim.*, 1915, v. 31, p. 145 et *Am. Ch. Soc.*, 1914.

2. KOBER, *J. of Biol. Chim.*, 1912-1913, v. 13, p. 485 et *J. of Am. Ch. Soc.*, 1915, v. 37, p. 2373.

3. DIÉNER, *C. R. A. S.*, 1914, v. 158, p. 1117.

Tous ces appareils ne présentent qu'un degré d'approximation plus ou moins grand. D'abord, dans ces appareils fonctionnant le plus souvent comme diffusimètre, plus rarement comme opacimètre, le faisceau lumineux n'est pas parallèle, parfois il est constitué par la lumière solaire, sujette à variation d'intensité, et d'angle d'incidence vis-à-vis des termes de comparaison ; les plongeurs produisent des réflexions secondaires de la lumière et la sensibilité lumineuse de l'appareil est faible de ce fait. De plus, dans ces appareils, on utilise un étalon comme test, suivant trois dispositifs, généralement :

A. — Le test-étalon est un précipité de même nature et du même corps que celui qu'on dose.

Et on réalise ce précipité à une concentration voisine de celui que l'on veut doser.

B. — Un étalon reste fixe et invariable, ce qui produit parfois une grande différence des hauteurs des plongeurs ou des godets.

C. — Ou bien l'épaisseur du milieu à examiner est constante, tandis qu'on cherche dans une gamme d'étalons celui qui permet l'obtention de l'égalité d'éclairement.

Dans ces deux derniers cas, une autre cause d'erreur intervient due à l'absorption propre et spécifique du milieu à examiner. De plus, la nature de l'étalon lui-même est sujette à critique du fait de la non-comparabilité spécifique des opalescences, non seulement comme l'indiquait bien RICHARDS (1) dans le cas des étalons de verres dépolis mais aussi dans le cas de suspension de sulfate de baryum, de kieselguhr, etc... Enfin, la non-identité des états physiques des deux termes de comparaison détermine une absorption différente dans les deux tubes; parfois même, le milieu à doser possède une coloration propre que n'a pas le test qui sert d'étalon. Mais même dans le premier cas envisagé où l'étalon est un précipité de même nature et composition que celui que l'on dose, il y a erreur, car seule, nous le verrons, la méthode photométrique obéissant aux lois optiques des milieux troubles, est correcte, alors que la méthode consistant à évaluer la différence de concentration de deux suspensions, en comparant les intensités de lumière soit absorbée, soit diffusée, dans les divers dispositifs (ayant, comme base, le colorimètre), n'est pas à l'abri de la criti-

1. W. RICHARDS, *loc. cit.*

que, surtout, nous le verrons, dans la mesure par diffusion. CHÉNEVEAU et AUDUBERT ont, en effet, montré que dans la loi de lord RAYLEIGH, généralisée par BOUTARIC :

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\frac{K N d^6}{\lambda n}}$$

l'exposant n de la longueur d'onde et par conséquent l'intensité de la lumière diffusée varie non seulement avec le diamètre des grains mais avec leur nombre. Telles sont les principales causes d'erreur inhérentes aux divers appareils cités plus haut, il en va sans dire de même aux comparaisons grossières faites dans des tubes tenus à la main ou dans le bloc de WALPOOLE. Nous ne parlerons point de certains appareils se disant simplifiés (1) et qui ne donnent que des résultats peu précis et subjectifs.

Quelques chimistes, la plupart Américains, ont mis sur pied des techniques analytiques utilisant les appareils que nous venons d'étudier. RICHARDS et WELLS (2) ont publié une méthode de mesure des chlorures, travail complété par celui de Lamb. CARLTON et MELDRUN (3) ; le dosage des chlorures a également été étudié par KLEINMANN (4). Un dosage des albumines des liquides de l'organisme (urine, liquide céphalo-rachidien) a été mis au point par FOLIN et DENIS (5), il est utilisé aux Etats-Unis, on en trouve des échos dans la littérature médicale de ce pays, BAUDOUIN l'a utilisé et préconisé (6). Le dosage des graisses du sérum sanguin par néphélémétrie a été préconisé par BLOOR (7), de même le dosage du calcium dans le sérum par LYMANN (8), le dosage des corps cétoniques par FOLIN et DENIS (9), le dosage des phosphates par KLEINMANN (10). Nous avons vu la critique qu'il convient de faire à ces appareils et aux techniques, qui doivent tenir compte des desiderata nécessaires aux dosages des milieux trou-

1. *Union pharmaceutique*, juillet 1921.

2. RICHARDS et WELLS, *loc. cit.*

3. CARLTON et MELDRUN, *Am. Ch. Journ.*

4. KLEINMANN (H.), *Kolloid Zeit.*, 1920 ; *Bioch. Zeitsch.*, 1919.

5. FOLIN et DENIS, *J. of biol. ch.*, t. XVIII, p. 263, 1914.

6. BAUDOUIN, *C. R. Soc. biol.*, 1920 et *Paris médical*, mai 1921.

7. BLOOR, *J. of biol. Ch.*, t. XVII, p. 377, 1914.

8. LYMANN, *J. of biol. Ch.*, t. XXIX, p. 169, 1917.

9. FOLIN et DENIS, *J. of biol. ch.*, t. XVIII, p. 263, 1914.

10. KLEINMANN, *Bioch. Zeitsch.*, t. XCIX, p. 115.

bles (lois optiques, stabilité, homogénéité). Il est de plus évident que dans ces méthodes préconisées par les Américains un certain entraînement et un facteur personnel jouent un rôle important et leur résultat varie trop suivant les expérimentateurs.

Il était question du début de ce chapitre des *propriétés optiques des solutions colloïdales* et des suspensions diluées à grains très fins ; pour mesurer la concentration en grains de ces préparations, des appareils ont été imaginés, utilisant le phénomène de *TYNDALL* ; ce phénomène consiste dans l'apparition d'un trouble lumi-

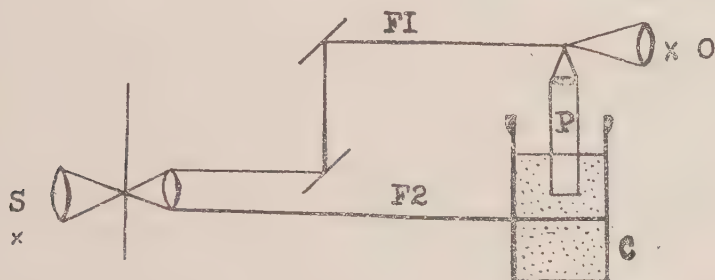


Fig. 2. — Schéma de l'appareil perfectionné de MEKLEINBURG.

S, Source lumineuse.
F1 et F2, Faisceaux lumineux.
C, Cuve contenant le liquide à examiner.
P, Plongeur en verre.
Q, Œil de l'observateur.

neux, marquant le passage d'un faisceau de lumière à travers une solution colloïdale ; on l'imagine en se rappelant la visibilité des poussières d'un appartement éclairé par un rayon de lumière : on conçoit que la raie lumineuse produite dans le milieu est plus ou moins forte suivant la concentration en grains ou l'état micellaire du milieu envisagé : tel est le principe de l'agglutinoscope de KUHN-WOITHE, du séroscope de DOLD (1) et des Tyndallimètres, Néphélémètres et Dispersomètres de SHEPART et ELLIOT (2). Le tyndallimètre de KAMMERLING ONNES et W. H. KEESON (3) construit en 1908, repose sur le même principe : l'intensité de la lumière diffusée par des particules solides éclairées par un faisceau incident et comparé à l'intensité du faisceau incident lui-même ; cet appareil a été perfectionné par MEKLEINBURG (fig. 2).

1. DOLD, *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, janvier 1920.

2. SHEPART et ELLIOT, *J. of the Am. Ch. Soc.*, t. XLIII, n° 3, mars 1921, p. 531-538.

3. KAMMERLING ONNES et KEESON, *Ac. des S. Amsterdam*, 1908.

Cependant, les savants qui ont travaillé à dégager les lois de l'action des milieux troubles sur la lumière, ont cherché à réaliser pratiquement des appareils d'un autre ordre que ceux cités plus haut et qui, partant, donnent des résultats supérieurs. Ce sont les spectrophotomètres et photomètres à lumière monochromatique parallèle ; nous verrons les principes mis en jeu dans ces appareils.

A la suite des travaux de lord RAYLEIGH, divers chercheurs construisirent des spectrophotomètres destinés à mesurer des intensités lumineuses, ou bien destinés, en comparant les radiations élémentaires d'une lampe, à celles correspondantes d'un étalon connu, à déterminer la composition numérique d'un flux complexe donné par la lampe étudiée, en prenant comme unité chacune des radiations élémentaires de l'étalon, ou bien, ce qui intéresse le plus la chimie analytique, destinés à déterminer pour un milieu absorbant, la valeur numérique du coefficient d'absorption et cela pour les radiations comprises dans le spectre lumineux ; un des premiers microphotomètres précis, a été construit en 1900 par Frantz HARMANN qui l'a utilisé à des recherches astronomiques et recherches sur la lumière (1) ; cet appareil auquel on peut faire des reproches pour son coin photométrique étalon a été légèrement modifié par BAILLAUD. En 1912, MM. FABRY et BUISSON construisent un microphotomètre à coin photométrique parfait (2), mais il est d'une manipulation assez délicate.

En 1910, Ch. FÉRY (3) a préconisé son spectrophotomètre à absorption, qui retiendra notre attention dans les dosages pratiques qui seront exposés.

D'autres appareils utilisant les données premières de BAILLAUD, FABRY, Ch. FÉRY, ont été construits tant en France qu'à l'étranger : citons le spectrophotomètre différentiel de D'ARSONVAL, le photomètre de CROVA, le photomètre d'YVON, le photomètre de NUTTING. Nous en donnerons un aperçu sommaire dans un chapitre spécial.

1. *La Nature*, nov. 1920.

2. Cette question de l'obtention d'un coin photométrique, étalon de mesure est le point délicat de la fabrication des spectrophotomètres et photomètres de types divers. Elle a fait l'objet de nombreux travaux et récemment a été l'objet des recherches pratiques remarquables de M. R. FABRY dans ses travaux sur l'absorption des rayons ultra-violets.

3. *Journal de physique*, 4^e s., t. 9, 1910.

Récemment un petit appareil conçu par MM. BAUDOUIN et BÉNARD (1) a été proposé pour les dosages néphélométriques pratiques, c'est un microcolorimètre, pouvant avantageusement fonctionner comme spectrocolorimètre et spectrophotomètre, nous exposerons aussi les résultats obtenus en analyse biologique avec cet appareil.

A la suite de leurs travaux, cités plus haut MM. CHÉNEVEAU et AUDUBERT (2) ont fait construire un opacimètre qui sera étudié ; de même VLÈS (3), à la suite de ses travaux sur le dosage opacimétrique des suspensions microbiennes, appareil qui sera étudié.

Enfin, réunissant les avantages de ces appareils et spécialement construit (au point de vue pratiqué, cuve, etc... et de la lumière choisie) pour des dosages optiques dans des milieux biologiques (sang, liquide céphalo-rachidien), le photomètre à lumière monochrome de VERNES, BRICQ, YVON, présente un intérêt dont nous avons les premiers tiré partie en analyses biochimiques (4).

Spectrophotomètre de FÉRV, spectrophotomètre de BAUDOUIN et BÉNARD, photomètre de VERNES, BRICQ et YVON, sont les trois appareils que nous avons étudiés spécialement et sur lesquels nous avons mis au point des techniques de précipitation et de mesure par absorption des composants des milieux biologiques ; ces trois appareils présentent des intérêts scientifiques et pratiques et correspondent à des usages qui seront exposés. Nous les décrirons après l'exposé des lois auxquelles ils répondent. Chacun de ces appareils a ses avantages et son intérêt propre, qui seront mis en lumière ; ce sont les travaux qui ont abouti peu à peu à ces lois fondamentales, l'exposé de ces lois et de leurs applications pratiques réalisant les appareils spectrophotomètres et photomètres à lumière monochromatique, qu'il importe d'exposer.

1. BAUDOUIN et BÉNARD, *C. R. Soc. Chim. biol.*, 1^{er} mai 1920, t. IV, 1922, p. 454.

2. CHÉNEVEAU et AUDUBERT, *C. R. A. S.*, t. 168, p. 553, 1919, p. 766 ; *Ann. de Physique*, t. XIII, 9^e série ; *La Nature*, 27 nov., 1920, p. 347 ; *Presse médicale*, p. 75, 1^{er} février 1922 et p. 324, 25 février 1922 ; *S. M. S.*, p. 153, mai 1924.

3. VLÈS, *J. de Physique*, *C. R. A. S.*, loc. cit.

4. TAILLANDIER (M.), *Journ. Pharm. et Chim.* (8), 1927, 6, et *C. R. Soc. Biol.*, 1927, t. 97, p. 557 et 706.

Chapitre II

LOIS FONDAMENTALES DES MILIEUX TROUBLES

LEUR MISE EN ŒUVRE PRATIQUE POUR LA CONSTRUCTION DES APPAREILS DE MESURES OPTIQUES

I

LOIS FONDAMENTALES DES MILIEUX TROUBLES

L'exposé qui vient d'être fait sur les travaux relatifs aux milieux troubles et sur les applications pratiques de ces travaux, montre quelle est leur importance et leur domaine, qui comprend les suspensions, les solutions colloïdales, les émulsions.

Avant d'étudier la constitution et la nature des milieux troubles et les techniques de manipulation susceptibles de leur être appliquées, il faut définir le milieu trouble, et voir les lois reliant une propriété physique à la constitution du milieu, capables d'être utilisées pratiquement pour l'analyse.

« Tout d'abord, peut-on définir simplement un milieu trouble — écrivent CHÉNEVEAU et AUDUBERT (1), que nous aurons occasion de citer plusieurs fois dans cet exposé — en nous plaçant au point de vue des propriétés optiques, qui nous permettent de saisir de suite la différence entre le trouble et la transparence d'une solution, par exemple ? Nous ne le croyons pas. Certes, un milieu trouble est constitué, en général, par des particules en suspension dans un milieu intergranu-

1. CHÉNEVEAU et AUDUBERT, *Ann. de Phys.*, t. XIII, 1920, p. 135.

laire, mais ces particules pourront être opaques ou transparentes ; dans ce dernier cas, si l'indice de réfraction des particules transparentes est égal à l'indice de réfraction du milieu intergranulaire, le milieu paraît transparent ; c'est ce qui est à peu près réalisé pour des suspensions de résine provenant de la dissolution de certains caoutchoucs dans la benzine.

Si les indices de réfraction des milieux particuliers et interparticulaires ne sont pas les mêmes, ce milieu paraît trouble ; ainsi se comportent les émulsions d'huile dans l'eau, d'eau dans l'huile, les suspensions de résine (mastic, gomme, gutte, etc., chlorure d'argent, sulfate de baryum).

Il intervient donc dans la notion d'un milieu trouble non seulement cette constatation qu'il y a des particules solides ou liquides en suspension, dans un liquide ou un solide intergranulaire, mais aussi ce fait que la réfringence des milieux joue un rôle capital.

D'autre part, il est bien certain que les dimensions des particules et leur nombre auront leur influence.

Les propriétés optiques ont surtout été étudiées sur des milieux troubles à particules opaques — et ce sont des milieux qui nous intéressent pratiquement ; on a recherché les facteurs d'action possible sur les propriétés optiques de tels milieux, diffusion, absorption, polarisation. La polarisation a été peu prise en considération, quoiqu'elle existe et n'est pas négligeable dans certains cas (milieux troubles à grains moyennement fins et gros). Parmi ces facteurs d'action, on a, au début, attribué surtout de l'importance au diamètre (1).

La théorie de lord RAYLEIGH sur le bleu du ciel, établie en admettant que la lumière se diffracte sur des particules petites vis-à-vis de la longueur d'onde incidente, l'a amené à la formule suivante, qui mesure la lumière absorbée pour une épaisseur du milieu traversé, égale à l'unité :

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\frac{K N d^6}{\lambda^4}}$$

dans laquelle N est le nombre des particules de diamètre d par unité de volume, I_0 l'intensité de la lumière incidente de longueur d'onde λ , I l'intensité de la lumière transmise et K un coefficient qui dépend des propriétés optiques de la particule et du milieu intergranulaire. Divers travaux de ABNEY, de HURION, de CROVA, de PERTNER et ERRENHAFT, surtout de BOUTARIC ont montré que, dans le cas de particules très petites de diamètre vis-à-vis de la longueur d'onde, l'exposant de ce dernier facteur dans la formule de lord RAYLEIGH est égal à 4.

1. Lord RAYLEIGH, *Phil. Mag.*, février 1871.

BOUTARIC (1) a montré que, dans beaucoup de cas, précipitation de AgCl par exemple, il n'atteint cette valeur qu'à l'instant même de la formation du précipité (parce que le grain est très fin à ce moment), et cela à cause de la variation des dimensions des grains constituant ce dernier ; aussi, à la suite de ses travaux sur le précipité de chlorure d'argent, BOUTARIC (2) a été amené à proposer une formule plus générale que celle de lord RAYLEIGH, de la forme :

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\frac{K \cdot x}{\lambda^n}}$$

où x est l'épaisseur traversée. BOUTARIC, en étudiant la variation de n depuis le moment de la formation du précipité de chlorure d'argent, a trouvé que n variait depuis $+4$ à l'état initial, jusqu'à $+2$ au bout de 60 minutes environ. Ces limites sont restreintes et font penser que les augmentations correspondantes du diamètre des particules sont faibles. Cependant KEEN et PORTNER (3) ont trouvé des variations plus considérables dans l'étude de l'absorption de la lumière à travers du soufre précipité de l'hyposulfite de soude par un acide ; ils ont vu que, un tel milieu d'abord très absorbant sous le violet, au bout d'un certain temps le devenait davantage pour le rouge.

En appliquant ces résultats à la formule de BOUTARIC :

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\frac{K \cdot x}{\lambda^n}}$$

on voit que n peut donc être indifféremment positif ou négatif. »

Notons encore, à propos de la formule de lord RAYLEIGH que W. MECKLENBURG (4) et S. VALENTINER ont voulu l'appliquer à la mesure de la grandeur des micelles colloïdaux. En effet lord RAYLEIGH a donné la formule :

$$I = \frac{K \cdot n \cdot \varphi^2}{\lambda^4}$$

où I est l'intensité de la lumière observée dans la direction perpendiculaire au rayon de TYNDALL ; n est le nombre de micelles, φ est le volume de la micelle ; λ la longueur d'onde lumineuse ; si on dé-

1. BOUTARIC, thèse, 1918. Paris.

2. Idem.

3. KEEN et PORTNER, *Proced. Roy. Soc.*, t. LXXXIX, 1914, p. 370.

4. W. MECKLENBURG, *Zeit. für Instrumentenkunde*, 1914, v. 34, p. 209.

signe par C la masse totale des micelles dans une moitié de volume, $n \nu s = C$, ou s est la densité de la micelle, on a :

$$I = \left(\frac{C V}{\lambda^4 S} \right) K.$$

CLAUSIUS (1) a proposé auparavant une formule à peine différente de la précédente :

$$I = \left(\frac{C V}{\lambda^3 S} \right) K.$$

Lord RAYLEIGH et ceux qui ont vérifié ses lois, que nous venons d'exposer rapidement, ont mis en évidence *la variation de l'absorption pour les différentes radiations* et l'influence des facteurs nombre et diamètre sur la lumière transmise. Ceux qui ont poursuivi et vérifié les travaux de lord RAYLEIGH ont montré expérimentalement *l'action de N et d sur l'exposant n de la longueur d'onde et déterminé cet exposant*, pour des particules petites.

Ces travaux ont marqué le début des mesures opacimétriques en lumière monochromatique et guidé la fabrication des premiers photomètres monochromatiques et spectrophotomètres.

CHÉNEVEAU et AUDUBERT ont approfondi l'étude du diamètre et mis en relief *la corrélation entre le diamètre et la variation subie par n* dans la formule de lord RAYLEIGH ; ils ont cherché à l'appliquer sur des grains dont les dimensions sont de l'ordre de la longueur d'onde de la lumière incidente ou plus grande qu'elle ; ils ont également complété les travaux de lord RAYLEIGH en étudiant systématiquement *l'influence du nombre de grains de même diamètre*. Ces auteurs ont utilisé pour leurs études des émulsions de gomme-gutte et de mastic obtenues par précipitation par l'eau de solutions alcooliques de ces résines. Les deux émulsions obtenues sont stables, constituées par des grains que l'on peut considérer comme sphériques et transparents ; la préparation de mastic est incolore, celle de gomme-gutte présente une belle coloration jaune.

CHÉNEVEAU et AUDUBERT ont fait également des mesures sur de fins précipités d'AgCl et de SO^4Ba , ce qui, pratiquement, nous intéresse particulièrement.

1. CLAUSIUS, *Pogg. Ann.*, 1847, v. 72, p. 294 ; 1849, v. 76, p. 161.

Pour préparer les émulsions de grains de diamètre connu et connaître leur nombre par unité de volume, ces auteurs ont utilisé la centrifugation fractionnée (1) et préparé ainsi toute une série d'émulsions de mastic et de gomme-gutte, suivant une échelle de diamètre allant de 1 à $12\ \mu$ et de concentration en grains de 10^6 à 5×10^8 grains par cm^3 .

« Bien que le procédé d'obtention de gros grains permette d'en obtenir de $50\ \mu$ de diamètre, nous (2) n'avons pu utiliser pour nos expériences que des granules d'un diamètre inférieur à $12\ \mu$; car, à partir de cette valeur, les sphérules formés présentent des inclusions ou un revêtement de particules beaucoup plus petites, ce qui modifie leurs propriétés optiques. En outre, la mesure eût été difficile à cause d'une très importante sédimentation.

Les évaluations des paramètres N et d ont été obtenues par un grand nombre de mesures microscopiques (pour les concentrations, méthode semblable aux méthodes hématimétriques; pour les diamètres, méthode des alignements de PERRIN). La précision calculée est en moyenne de 3 %.

Les mesures de l'absorption ont été effectuées au moyen du spectrophotomètre de FÉRY. Afin de pouvoir éliminer l'erreur, assez considérable, provenant des défauts et de la sensibilité de l'œil (BROCA), nous nous sommes astreints à faire, pour une seule émulsion, plusieurs mesures se contrôlant ainsi par elles-mêmes. Nous sommes arrivés de cette façon à déterminer par une série d'expériences l'approximation de nos mesures et nous avons trouvé 4 à 5 %.

Nous avons effectué, pour contrôler cette précision, la vérification de la loi exponentielle ordinaire reliant l'épaisseur du milieu traversé à l'intensité transmise. Pour éviter d'introduire dans les formules des constantes de grandeurs numériques considérables, nous avons été amenés à prendre comme unité de longueur le μ (10^{-4} cm.) et comme unité de volume le μ^3 (10^{-12} cmc.).

Les résultats expérimentaux sont :

1° L'absorption. Nous avons mesuré l'absorption des différentes séries d'émulsions préparées comme il a été indiqué plus haut en cherchant si les résultats numériques montraient l'existence de relations

1. J. PERRIN, *Les Atomes*, 1913.

2. Je cite ici un extrait de l'article de MM. CHÉNEVEAU et AUDUBERT dans les *Annales de Physique*, t. XIII : la question ne pouvant être mieux exposée.

simples entre le rapport $\frac{I}{I_0}$ de la lumière transmise à la lumière reçue et les paramètres N et d déjà définis. Nous avons représenté nos résultats par des courbes en portant en ordonnées le rapport $\frac{I}{I_0}$ et en abscisses, soit N , soit d . Dans les deux cas, le coefficient de transmission est une fonction continue de la variable considérée. Mais comme ces courbes ne s'étagaient pas toujours par ordre de grandeur croissante de N ou

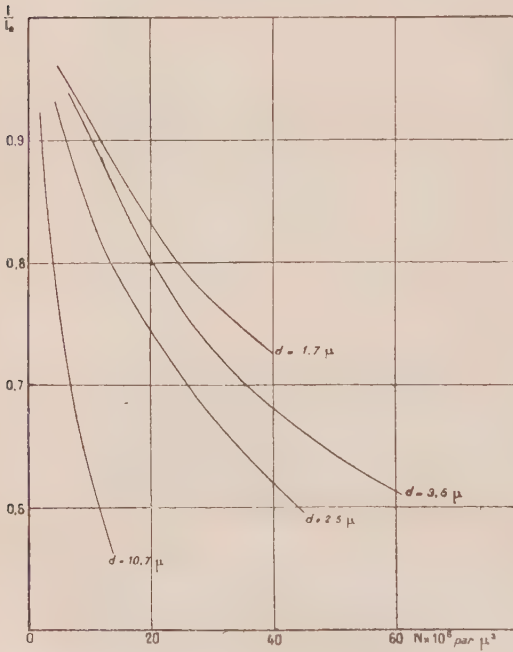


Fig. 3.

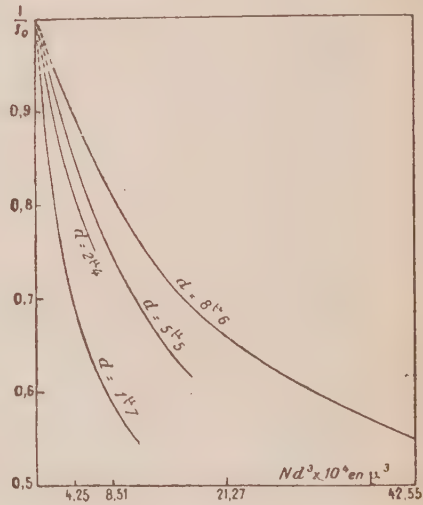


Fig. 4.

de d (fig. 3), nous avons eu l'idée de prendre comme variable indépendante le produit Nd^3 qui, à un facteur constant près, représente le volume total des particules ou leur masse totale. L'anomalie précédemment constatée disparaît, comme il est indiqué dans la figure 4.

La fonction $\frac{I}{I_0} = \int (Nd^3)$ peut être déterminée facilement ; si l'on porte en ordonnées les valeurs correspondantes de $\log [-\log (1-I/I_0)]$, et en abscisses les valeurs de $\log (Nd^3)$, les points graphiquement obtenus

nus se placent très sensiblement sur des droites dont l'équation est :

$$\log \left[-\log (1-1/10) \right] = \log K - \alpha \log Nd^3.$$

Il est curieux de remarquer que le coefficient angulaire des droites obtenues pour une longueur d'onde déterminée est le même, quelle que soit la nature ou le diamètre de la particule ; d'autre part, l'ordonnée à l'origine ($\log K$) est liée par la formule suivante au diamètre :

$$\log K = \log A + \beta \log d.$$

dans laquelle A et B sont des coefficients qui varient, le premier A avec la longueur d'onde et la nature de la particule, et le second B avec la nature de la particule seulement.

En définitive, tous ces résultats peuvent être résumés dans la formule suivante, indiquant une relation entre l'absorption $I - \frac{I}{I_0}$ de l'émulsion et ses propriétés physiques.

$$I - \frac{I}{I_0} = e - \frac{Ad^B}{Nd^3} \alpha$$

Les valeurs mesurées de $\frac{I}{I_0}$ sont indiquées dans le tableau qui suit ; il donne pour deux longueurs d'onde la valeur des coefficients de la formule pour le mastic et la gomme-gutte :

L		B	A	
$\lambda = 0 \mu 644$	$\lambda = 0 \mu 498$		$\lambda = 0 \mu 644$	$\lambda = 0 \mu 498$
Mastic	0,5	0,4	0,5	$1,8, 10^{-6}$ $1,0, 10^{-2}$
Gomme gutte..	0,5	0,4	1	$1,1 id.$ $0,6 id$

Les valeurs calculées par la formule précédente, aux erreurs d'expérience près, valables seulement pour des particules dont le diamètre est supérieur à la longueur d'onde, sont semblables aux valeurs observées. Voici quelques exemples, au hasard : pour $\lambda = 0 \mu 644$.

		$\frac{I}{I_0}$ calculé	$\frac{I}{I_0}$ observé	Approximation
Mastic	{ n° 16	0,93	0,93	0 %
	{ n° 2	0,66	0,64	3 %
	{ n° 1	0,57	0,56	2 %
Gomme-gutte.	{ n° 15	0,94	0,91	3 %
	{ n° 5	0,72	0,70	3 %
	{ n° 1	0,55	0,56	2 %

Les coefficients d'extinction trouvés pour le mastic sont toujours plus faibles que ceux de la gomme gutte ; cette différence est de l'ordre de 0,14 et ne dépend ni des dimensions, ni des nombres de particules. Vraisemblablement, elle caractérise l'absorption due à la coloration de la gomme-gutte.

Voici un exemple pour $\sigma\mu$ 644 :

	d	Nd^3	$\frac{I}{I_0}$		Différence
Mastic	1 μ 7	400	0,84	0,7	0,14
Gomme-gutte		600	0,77	0,64	0,13
Mastic	2 μ 5	600	0,72	0,58	0,14
Gomme-gutte		1000	0,8	0,66	0,14
		1600	0,88	0,75	0,13

La relation trouvée expérimentalement ne met pas nettement en évidence l'influence due à la longueur d'onde, tandis que la formule de lord RAYLEIGH applicable aux toutes petites particules explique la variable. L'expression n'est pas applicable aux particules dont les dimensions sont grandes vis-à-vis de la longueur d'onde de la lumière incidente. On peut se demander si, en la modifiant, on peut l'étendre aux grosses particules. Dans ce cas en la remplaçant par la formule indiquée par BOUTARIC :

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\frac{A}{\lambda^n}}$$

A, étant une certaine fonction de N, de d et des propriétés optiques des particules et du milieu interparticulaires, l'expérience nous a montré qu'en portant en abscisses les valeurs de $\log$ et en ordonnées les valeurs correspondantes de $\log \left(1 - \frac{I}{I_0} \right)$ on obtenait des droites de la forme : $\log \left[1 - \log \left(1 - \frac{I}{I_0} \right) \right] = \log A + n \log \lambda$.

Le résultat fait voir qu'il est juste d'appliquer la formule aux grosses particules et que l'exposant n est indépendant de la longueur d'onde, comme l'ont confirmé un très grand nombre de mesures faites sur des inclusions précipitées et des émulsions d'huile dans l'eau et d'eau dans l'huile. D'autre part, dans les limites où nous étions, nous avons trouvé que la fonction A était de la forme :

$$A = K N d$$

K étant un coefficient ne dépendant uniquement que des propriétés optiques des granules et du milieu intergranulaire. En admettant que

ce facteur de proportionnalité est identique à celui de la formule de lord RAYLEIGH,

$\frac{8 \pi^3}{8} \left(\frac{D' - D^2}{D} \right)$ on trouve, en l'égalant à la valeur numérique obtenue pour K par unité d'épaisseur traversée :

$\frac{D' - D}{D} = 0,09$; il est

intéressant de faire remarquer que cette valeur est précisément celle

du rapport $\frac{N^2 - N_0^2}{N^2 + 2 N_0^2}$, où N (1,48 environ) et N₀ (1,33 environ) représentent les indices du granule et du milieu intergranulaire. L'absorption, en somme, peut être représentée par la formule :

$$I - \frac{I}{I_0} = e - \frac{K N d}{\lambda^n}$$

2° Cette formule présente un avantage considérable, car elle met en évidence, la variation de l'absorption pour les différentes radiations.

En effet, en mesurant les intensités I' et I'' transmises par deux longueurs d'onde λ' et λ'' on a, n étant indépendant de la longueur d'onde

$$n = \frac{\log \left(-\log \frac{I'}{I_0} \right) - \log \left(-\log \frac{I''}{I_0} \right)}{\log \lambda' - \log \lambda''}.$$

Nous avons déterminé les valeurs de n pour les séries d'émulsions homogènes de concentrations et de diamètres différents, les résultats sont indiqués dans le tableau récapitulatif.

L'examen de ce tableau montre que n dépend à la fois de N et de d ; on pouvait prévoir l'influence du diamètre mais il n'en était pas de même de celle du nombre des particules par unité de volume et c'est un phénomène qui, à notre connaissance, n'a jamais été signalé. Cette étude systématique montre cependant que les lois de variations avec N et avec d sont analogues :

1° Pour chaque diamètre, les courbes n = f(N) fig. 5, présentent un

minimum surtout accentué pour les gros diamètres et dont la position s'éloigne de l'origine à mesure que le diamètre diminue. Dans les limites de l'expérience, la loi de variation de n semble, pour des concentrations élevées et de petits diamètres, pouvoir être représentée par la relation.

2° Les courbes n = f(d) fig. 6 présentent également des minima d'autant plus éloignés de l'origine que N est plus faible ; en outre, la grandeur de ces minima diminue avec la concentration. Les prolongements de ces courbes jusqu'à d'ordonnée à l'origine semblent concourir

rentes au point $n = 4$ pour les valeurs de d voisines de zéro. Ce résultat confirme la loi de Lord RAYLEIGH pour les petites particules.

Cette extrapolation n'a pu être réalisée avec suffisamment de précision pour les courbes $n = \int (N)$.

3° L'ensemble de ces résultats montre donc que n est une fonction continue des deux variables N et d et peut prendre toutes les valeurs possibles positives ou négatives, entre une limite supérieure qui est très vraisemblablement 4 et une limite inférieure qui, dans nos expériences, n'a pas dépassé 1.

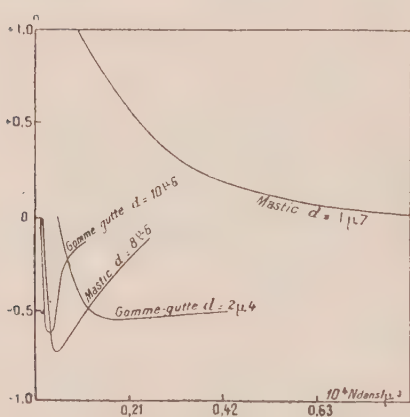


Fig. 5.

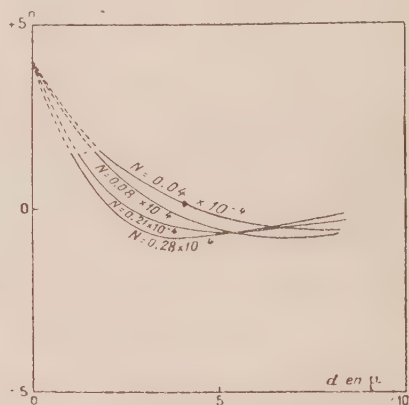


Fig. 6.

Quand n est positif, le milieu est plus absorbant pour les petites longueurs d'onde ; le contraire a lieu quand n est négatif, le rouge étant le plus dispersé. En particulier, à diamètre constant, la dispersion du milieu étant seulement fonction du nombre de particules, n peut passer d'une valeur négative à une valeur positive, quand N diminue. Nous avons obtenu de très nets résultats avec des suspensions de gomme gutte et de mastic de diamètre voisin de 1,7. Pour la première fois quand N varie de $4 \cdot 10^7$ à $1,6 \cdot 10^7$ par cmc., n passe de $-0,51$ à plus 1,0.

Incidemment, il est intéressant de remarquer que l'on peut faire une nouvelle vérification de la loi de Lord RAYLEIGH dans le cas des petites particules en portant en abscisses les valeurs de $1/10$ et en ordonnées, les valeurs correspondantes de n . On obtient alors des courbes dont l'allure est analogue à celle des courbes précédentes. Certaines présentent également un minimum, et toutes prolongées semblent passer par le point.

5° Le calcul permet de déterminer la forme de la fonction $n = \Phi(N, d)$.

En effet, en se reportant aux formules établies précédemment par l'absorption par les milieux troubles à grosses particules, on a en les égalant :

$$I - e \frac{K N d}{\lambda n} = e - \frac{A d \beta}{(N d^3)^\alpha}$$

d'où, en développant en série le premier membre jusqu'au second terme :

$$\frac{K N d}{\lambda n} = C - \frac{A d \beta}{(N d^3)^\alpha}$$

et, en prenant les logarithmes népériens :

$$(1) \quad n = \frac{1}{\log_e \lambda} (\log_e K + \log_e N + \log_e d + \frac{A d \beta}{(N d^3)^\alpha})$$

Si l'on prend la dérivée seconde de n par rapport à N , par exemple, on obtient la valeur :

$$\frac{d^2 n}{d N^2} = \frac{\alpha}{N_1^2 \log_e \lambda}, \quad N_1 \text{ étant la valeur pour laquelle s'annule la dérivée}$$

$\frac{d n}{d N}$, c'est-à-dire $N_1 = (A d \beta - 3 \alpha) \frac{1}{\alpha}$. Comme α et N^2 sont positifs et

que $\log \lambda$ est toujours négatif, il en résulte que $\frac{d^2 n}{d N^2}$ est toujours infé-

rieur à 0. La valeur N_1 correspond donc bien à un minimum pour n . Un raisonnement analogue, étant donné la symétrie de la formule, indiquerait un minimum pour n quand on considère d comme variable. L'expérience a d'ailleurs justifié cette manière de voir. En remplaçant en effet dans la formule des diverses constantes par leurs valeurs expérimentales et en calculant n , on trouve des nombres qui coïncident, aux erreurs d'expériences près, avec les valeurs observées. Il en est de même pour la valeur du minimum et de N_1 qui lui correspond.

La formule (1) montre bien aussi que les minima des courbes obtenues quand N ou d sont indifféremment considérés comme variables sont d'autant moins accusés que d ou N sont plus petits. Enfin, on retrouve également la loi logarithmique obtenue expérimentalement pour des milieux à grains petits et à concentrations notables, car le dernier terme peut alors être négligé.

Milieux troubles non homogènes. — Nous nous sommes bornés jusqu'à maintenant à étudier l'absorption et la dispersion observées dans les milieux constitués par des granules de même diamètre.

La formule établie expérimentalement pour ces milieux homogènes pouvait permettre de prévoir l'extension des résultats acquis à des mi-

lieux troubles contenant des particules de diamètre différents. L'expérience est venue confirmer cette hypothèse.

1° Tout d'abord, en ce qui concerne l'absorption, nous avons remarqué que cette dernière était une *fonction continue de la masse* des grains. Nous avons vérifié ce fait sur des suspensions de fins précipités de chlorure d'argent, de sulfate, de chromate de baryum et sur des émulsions non homogènes de mastic ou de gomme gutte titrées directement par pesées. Nous avons, en effet, trouvé par ces différents milieux, la formule suivante :

$$I - \frac{I}{I_0} = e - \frac{B}{M \beta}$$

M représentant la masse totale des particules, B et β étant deux coefficients dépendant seulement de la nature des grains en suspensions et de la longueur d'onde de la lumière utilisée.

Si l'on suppose, en effet, un milieu trouble constitué par un mélange de grains de diamètre différents, pour chaque série de grains on doit avoir :

$$\log \left[- \log \left(I - \frac{I_1}{I_0} \right) \right] = A_1 - \alpha \log (N_1 d_1^3)$$

$$\log \left[- \log \left(I - \frac{I_p}{I_0} \right) \right] = A_p - \alpha \log (N_p d_p^3)$$

Si l'on admet, ce qui est vraisemblable, une répartition des particules telle que $N_1 d_1^3 = N_2 d_2^3 \dots$ et si l'on appelle $\frac{I}{I_0}$ le coefficient de transmission du mélange, on arrive facilement à une équation de la forme :

$$\log_e \left(I - \frac{I}{I_0} \right) = \frac{e}{N d^3} \beta$$

En désignant par M la masse totale des particules de densité δ et par p le nombre de diamètres différents, on a :

$$\log_e \left(I - \frac{I}{I_0} \right) = \frac{C p \beta \delta \beta}{M B} = \frac{B}{M \beta}$$

d'où :

$$I - \frac{I}{I_0} = e - \frac{B}{M \beta}$$

Cette influence de la masse sur les propriétés absorbantes des milieux troubles a déjà été trouvée sous une forme analogue pour les solutions colloïdales métalliques, en particulier par GARNETT. Tout dernièrement

O. BROCH et F. F. RENWICK en étudiant l'opacité surfacique des émulsions d'argent des plaques photographiques trouvèrent empiriquement une loi logarithmique entre l'absorption et la masse, tout à fait semblable à la formule que nous avons nous-mêmes trouvée. Plus récemment enfin, M. F. VLÈS trouva, entre l'absorption et la masse totale de ces dernières, une formule analytique simple représentée par une relation hyperbolique.

Etant donné les conditions très dissemblables dans lesquelles ces diverses études ont été effectuées, il se peut que les formes précédentes de la loi de masse trouvée ainsi dans chaque cas, soient exactes dans les limites expérimentales. Mais il n'en est pas moins vrai qu'il existe une relation générale simple entre l'absorption et la masse totale du corps en suspension produisant le trouble optique.

En ce qui concerne notre travail, nous pensons que la loi exponentielle trouvée est celle qui s'accorde le mieux quand on opère sur des particules dont le diamètre varie de 1 à 12. Nous pouvons même ajouter que cette loi s'applique encore à des particules de diamètre inférieur à $1\ \mu$. Nous avons, en effet, effectué des mesures sur des particules ultra-microscopiques, réfractaires à la centrifugation, et dont le diamètre était de l'ordre de $0\ \mu\ 1$ environ et nous avons retrouvé la loi exponentielle de la masse.

2° En ce qui concerne la *dispersion par diffusion intérieure* nous avons retrouvé pour les milieux hétérogènes les résultats obtenus dans les cas d'émulsions homogènes : n est une fonction des deux grandeurs N et d et les courbes, tracées en considérant successivement N et d comme variables, ont la même allure que celles correspondant aux émulsions à grains sériés. Comme pour ces dernières, elles semblent concourantes au point $n = 4$, quand d tend vers 0. De même, n peut indifféremment, suivant les cas, prendre des valeurs positives ou négatives.

De plus, pour de grandes concentrations et un mélange de particules de diamètres moyens et petits nous avons retrouvé la loi logarithmique déjà obtenue : $n = A + B \log N$. Ces résultats ont été confirmés par un très grand nombre de déterminations portant sur des milieux très divers comme : des suspensions de fins précipités de chlorure d'argent, de sulfate, de chromate de baryum, des émulsions d'huile dans l'eau ou d'eau dans l'huile et des émulsions de gomme-gutte et de mastic. »

Les travaux de MM. CHÉNEVEAU et AUDUBERT ont montré qu'il existe une relation simple entre l'absorption, la grosseur et le nombre des particules dans le cas des milieux à gros grains, cette relation étant :

$$I - \frac{I}{I_0} = e - \frac{AdB}{(Nd^3)}$$

relation représentée aussi par la formule de lord RAYLEIGH

$$\frac{I}{I_0} = e - \frac{A}{d^3}$$

transformée par BOUTARIC ou par la formule de RAYLEIGH modifiée par CHÉNEVEAU et AUDUBERT :

$$I - \frac{I}{I_0} = I - e - \frac{K N d}{\lambda^2}$$

formule qui met nettement en évidence la variation de l'absorption pour les diverses longueur d'onde et permet de calculer n .

CHÉNEVEAU et AUDUBERT ont montré, contrairement à l'idée de certains expérimentateurs qui évaluent la différence de concentration de deux *suspensions en comparant les intensités de lumière diffusées par elles...* la variation de n de la longueur d'onde et par suite, de la lumière transmise, avec les variations de la concentration.

Ils ont montré que, pour un diamètre déterminé l'absorption est une fonction continue du volume total des particules et donc de leur masse et, par suite, ont démontré qu'il est possible par la mesure directe de $\frac{I}{I_0}$ d'évaluer la teneur d'une suspension même à grains hétérogènes à condition qu'elle soit stable et homogène, dans la répartition de ses éléments.

Les travaux de M. VLÈS (1) marquent aussi un pas dans la science de la mesure optique. Il a étudié d'une façon scientifique et rationnelle les propriétés optiques des émulsions bactériennes. Comme nous l'avons dit à propos des méthodes optiques des milieux troubles, lui aussi a critiqué les procédés empiriques où semblent vouloir se cantonner ceux qui ont tenté de doser les émulsions de bactéries par opacimétrie ; tels les procédés empiriques de DREYER, de DOUGLAS, de GOSIO. Cherchant à établir une théorie des phénomènes optiques, absorption et diffusion, il a effectué une

1. VLÈS, *Propriétés optiques des émulsions bactériennes* (C. R. A. S., t. 168, p. 575, 794, 797 et C. R. S. de biol., 1912, 12 avril).

série de recherches, d'abord au spectrophotomètre, ensuite au moyen d'opacimètre à faisceau lumineux monochromatique, sur des émulsions de diverses bactéries vivantes, et principalement de bacilles typhiques récoltés dans l'eau à partir de cultures sur gélose.

Nous citons ses remarques (1) :

« Les méthodes de dosage usuelles des bactéries (numération directe en cellule quadrillée, numération indirecte par rapport à une émulsion sanguine étalonnée, poids sec d'un culot de centrifugation, etc...) sont minutieuses et longues et difficilement applicables à des problèmes semi-industriels, comme la production en grande quantité d'émulsion bactérienne destinée à des vaccins ; aussi quelques auteurs ont-ils en pareil cas fait appel à des méthodes plus rapides fondées sur l'observation des pertes que subit la lumière en traversant l'émulsion considérée (diaphanoscopie, opacimétrie ; cf. DREYER, DOUGLAS, VLÈS, GOSIO, etc...).

La plupart de ces procédés ont été empiriques et aucune étude de la théorie des phénomènes n'a encore été donnée, malgré tout l'intérêt qu'on aurait eu à savoir jusqu'à quel point peuvent être égales deux émulsions bactériennes de même opacité.

Nous avons effectué à cette intention une série de recherches d'abord au spectrophotomètre, ensuite au moyen d'opacimètre (sortes de photomètres monochromatiques construits pour le dosage courant des émulsions bactériennes) sur des émulsions de diverses bactéries vivantes (principalement de bacilles typhiques) récoltées dans l'eau à partir de culture sur gélose.

L'ensemble des pertes que subit un faisceau lumineux traversant une émulsion bactérienne brute relève d'un complexe de phénomènes qu'on peut diviser en deux groupes :

A) Des phénomènes indépendants des bactéries eux-mêmes et *reliés principalement aux propriétés propres du liquide interbacillaire* chargé de matières colorantes empruntées aux milieux de culture et de matériaux colloïdaux divers ; l'étude spectrale des matières colorantes des milieux de culture usuels, nous a montré que, *ces matières absorbent principalement les courtes radiations du spectre visible*, et doivent renforcer, de ce côté, les pertes dans le complexe ; la comparaison des courbes spectrophotométriques d'émulsion de bacilles bruts et d'émulsion de bacilles

1. M. le Professeur Vlès nous a encouragé au cours de notre travail et offert l'appui de sa documentation ; nous le prions d'agréer l'expression de nos vifs remerciements.

lavés par centrifugation corrobore cette hypothèse. Une mesure diaphanométrique en lumière blanche, procédé pratique de plusieurs auteurs, est donc exposée à des erreurs fortuites assez considérables, tenant à l'intervention de ces facteurs contingents des milieux de culture ; au contraire, leur influence peut être fortement diminuée en restreignant les radiations employées à la plage spectrale d'absorption minima de ces milieux ; c'est ce que nous avons réalisé dans nos opacimètres.

B) Phénomènes dépendant des bactéries eux-mêmes.

L'étude spectrophotométrique d'émulsion de bactéries non homogènes (bactéries typhiques) vivants et lavés montre qu'ils ne possèdent pas de bandes d'absorption nettement différenciées ; l'élimination fondamentale croît d'une façon à peu près continue et progressive vers les courtes longueurs d'onde.

Quelle est la mesure de cette élimination ?

Les valeurs numériques trouvées ne s'accordent pas avec une loi exponentielle du type de celle de BEER-LAMBERT ; dans la limite des concentrations où nous avons pu expérimenter (grossièrement de 5 à 25 milliards de bactéries par centimètre cube), elles ne répondent pas davantage à la loi de Lord RAYLEIGH pour les « milieux troubles », même si l'on fait subir à celle-ci les corrections qu'a imaginé BOUTARIC pour le cas des grosses particules.

Nous avons vraisemblablement affaire à un mélange de phénomènes très divers (réfraction, etc...), venant se greffer sur la diffraction (1).

Des formules empiriques permettent de représenter en première approximation l'élimination des radiations à longueur d'onde courtes par une expression de la forme :

$$e \frac{I}{I_0} = K e^{-1 + R}$$

(e = concentration), les constantes K et R étant des fonctions linéaires de la longueur d'onde telles qu'on doit avoir, comme phénomène principal à concentration, etc. :

$$\frac{I}{I_0} = \alpha \lambda + B$$

Autour de cette droite fondamentale, un certain nombre de phénomènes secondaires, tenant peut-être au liquide interbactérien, créent des

1. Nous sommes ici dans un cas très particulier, où la concentration de l'émulsion lui donne une opacité considérable : une émulsion d'une vingtaine de milliards de bacilles typhiques par centimètre cube à opacité de 4 feuilles de papier à lettre superposées.

irrégularités, surtout importantes aux courtes longueurs d'onde, peu nombreuses pour les bacilles lavés, plus accentuées pour les émulsions brutes, très complexes dans les émulsions vaccinales, partiellement bactériolysées.

II. — L'étude de l'élimination bactérienne au moyen d'opacimètre à radiations sélectionnées (plage spectrale sur $\lambda = 620 \mu$ environ, région où le liquide interbacillaire avait son absorption minima), a donné quelques notions importantes sur les relations, entre la transmission d'une émulsion bactérienne et les caractéristiques de ses éléments. »

Et VLÈS conclut :

« 1° La transmission paraît liée assez directement à la quantité de substance présente dans l'émulsion.

On a en effet sensiblement :

$$\frac{I}{I_0} = e^{P} - 1 + \int$$

P étant le poids sec de bactéries par centimètre cube d'émulsions (bactéries lavés par centrifugation, puis séchés à poids constant), e et f constantes dépendant de certaines conditions expérimentales et peut-être de la spécificité bactérienne.

2° Une deuxième relation peut être mise en évidence avec les Dimensions des éléments de l'émulsion x ; si n est le nombre de bactéries (détermination approximative en assimilant la bactérie à son cylindre inscrit) on a

$$\frac{I}{I_0} = (A \bar{n} + 1) (C \bar{n} + 1) + D$$

Cette expression à deux termes se compensant fait penser au théorème de BRIDGE. Il est curieux de constater, par des expériences sur des bacilles autres que les typhiques, que les constantes de la formule précédente sont peut-être indépendantes de l'espèce.

Il y a donc, à transmission égale, une compensation possible, entre les dimensions des éléments et leur nombre, dans une sorte de quantum différant assez peu (tout au moins dans les limites de nos expériences) d'une fonction simple de la quantité de substance n v , la même expression rend compte de l'élimination par des émulsions d'éléments beaucoup plus gros (hématies de chien, de mouton, qu'on pourrait peut-être doser ainsi).

Quant au rôle optique de la répartition des éléments dans l'émulsion une étude de chacun des éléments groupés et d'émulsions en évolution

d'agglutination (tant que les bactéries sont répartis dans toute la masse, du liquide) n'a pas montré que le groupement ait une influence sensible sur la transmission, tout en passant comme si les éléments du groupe conservaient leur individualité.

Les conséquences pratiques de ces recherches sont que l'on peut tirer d'une mesure de transmission lumineuse à travers une émulsion bactérienne une notion approchée sur la *quantité de surface bactérienne* présente dans l'émulsion, à condition de se donner un certain nombre de limites expérimentales et, en particulier, *de restreindre la mesure à des radiations peu affectées par les propriétés du liquide interbactérien.* »

Les conclusions de M. VLÈS sont assez nettes pour ne pas insister ; de plus, celui-ci poursuivant ses travaux chercha à dégager la loi reliant la masse des éléments bactériens à la lumière, mettant ainsi ses travaux en relation avec les conclusions de MM. CHÉNEVEAU et AUDUBERT.

VLÈS écrit (1) :

« Nous avons indiqué dans une note précédente (p. 575 C. R. A. S., t. 168) que les pertes provoquées sur un faisceau lumineux à peu près monochromatique par une émulsion de bactéries ou d'hématies, peuvent être représentées par une expression approchée :

$$\frac{I}{I_0} = (A n - 1 + B) (C n^{-1} + D)$$

où le facteur fondamental est la quantité de substance n ν présente dans l'émulsion à l'état de particules.

Envisagée à volumes courants des éléments, c'est-à-dire en tant qu'équation de concentration, l'expression empirique définit une hyperbole qui est vraisemblablement une première approximation d'une équation exponentielle telle que :

$$\frac{I}{I_0} = e^{-K_1 c S}$$

S étant de l'ordre de 1.5 à 3 et c étant la concentration (nombre de particules à volume invariable par unité de volume d'émulsion) ; les mesures et courbes montrent qu'il y a superposition à peu près complète des hyperboles aux exponentielles (2).

1. VLÈS, C. R. A. S., t. 168, p. 794.

2. *Sur la transmission des émulsions de bactéries et d'hématies* (C. R. A. S., t. 168, p. 794).

De même, à concentration courante en nombre d'éléments, on peut faire correspondre à l'hyperbole empirique une exponentielle :

$$\frac{I}{I_0} = e^{-K_2 v t^1}$$

dans laquelle t est de l'ordre de grandeur de 5 ; on aurait donc finalement en réunissant ces résultats et en passant à la quantité de substance $n v$, une exponentielle générale :

$$\frac{I}{I_0} = e^{-K (n v) \frac{1}{u}}$$

avec u de l'ordre de 2.5, qui se superposerait à l'équation empirique.

La forme exponentielle pourrait paraître avantageuse en ce qu'elle permettrait de définir un coefficient spécifique K et qu'elle se rapprocherait vraisemblablement beaucoup plus de la loi théorique fondamentale régissant de tels phénomènes. Elle est en effet, assez comparable à la formule qu'ont donnée, tout récemment MM. CHÉNEVEAU et AUDUBERT (C. R. A. S., t. 168, p. 553) pour des émulsions à gros éléments, et elle est intéressante en ce que ne s'appliquant pas à des particules sphériques (plusieurs de nos bactéries sont cylindriques, ciliées et les hématites ont une forme complexe), elle pourrait étendre le domaine de la loi à des particules de formes quelconques.

Il est juste de faire remarquer, cependant, que pour les bactéries et hématies, la forme exponentielle se montre parfois, vis-à-vis des mesures expérimentales, d'un accord légèrement inférieur à celui de la formule hyperbolique ; tout se passe comme s'il y avait une légère croissance de s avec la concentration, de t avec le volume, de n avec la quantité de substance et, par conséquent, une petite relation corrélatrice des coefficients spécifiques $k_1, k_2 \dots K$.

Cela peut tenir, évidemment d'une part, à la forme aberrante des particules de nos émulsions, d'autre part à ce que les phénomènes n'y sont pas purs mais résultent de la superposition d'une série de composants qui évoluent en fonction de la concentration d'après des lois indépendantes. »

De ces travaux, il ressort donc :

1° Au point théorique, il existe une relation de forme exponentielle entre la masse totale d'éléments bactériens et l'absorption que subit un faisceau lumineux monochromatique dirigé sur la suspension bactérienne. Le liquide interbactérien absorbant fortement les courtes radiations du spectre solaire, il faudra éliminer

ces radiations du faisceau lumineux destiné à la mesure optique.

2° Au point de vue des appareils, ces travaux montrent la possibilité d'un dosage opacimétrique pour apprécier la masse des éléments bactériens (ce qui, d'ailleurs, est l'élément le plus intéressant à connaître dans la vaccinothérapie typhique ainsi que l'ont démontré certains auteurs).

Le faisceau lumineux devra être privé des courtes radiations et être aussi monochromatique que possible parce qu'en lumière blanche, l'action propre du milieu interbactérien interviendrait sur l'un des faisceaux seulement et il est nécessaire pour que l'œil puisse apprécier les plus petites différences d'intensité que les 2 faisceaux aient exactement la même nuance ; on sait aussi, ainsi que nous l'avons exposé, que les grains de diamètres différents n'ont pas une action égale sur les phénomènes d'absorption, de diffusion, de réflexion et de réfraction pour les diverses longueurs d'onde ; si donc on veut que la loi reliant la masse et l'absorption joue réellement, il faut opérer en lumière monochromatique.

Notons que la même remarque sur la longueur d'onde à choisir est à faire pour les appareils destinés à réaliser des dosages opacimétriques dans les liquides organiques divers (sérums, liquide céphalo-rachidien) ; il faut aussi, dans ces appareils, éviter les bandes d'absorption dues aux pigments sanguins, à l'hémoglobine et ses dérivés et employer des faisceaux lumineux de longueurs d'onde supérieures à 620 μ . M. VLÈS a conçu un appareil parfait (1) tenant compte de tous détails en vue des dosages opacimétriques des bactéries, il vient de l'adapter aux dosages opacimétriques en général (2).

Récemment, KLEINMANN a pensé simplifier encore les lois des mesures optiques par absorption ; il remarqua une proportion directe entre les intensités lumineuses et la concentration de 2 milieux troubles, à la condition expresse que la grandeur des grains soit identique (3) ; la formule de lord RAYLEIGH donne en effet :

$$I = \frac{n \nu 2 K}{y^4}$$

où I est l'intensité de la lumière observée, n le nombre de grains, y la longueur d'onde.

1. VLÈS, *C. R. A. S.*, t. 168.

2. VLÈS, Maison JOBIN et C^{ie}, fascicules.

3. Ces travaux ont été inspirés de ceux de MECKLENBURG et VALENTINER sur les méthodes de mesure des micelles colloïdaux.

Si l'on désigne par C la masse totale des grains dans une moitié de volume $n \varphi s = C$ et s la densité du grain, on a : $I = \frac{c \varphi}{y 4 S} K$ or, K, φ, s sont identiques dans les 2 termes de comparaison, on a donc (KLEINMANN) (1) :

$$\frac{I}{I_0} = \frac{C}{C_0}$$

formule qui donne une droite. Nous pensons que les conditions expérimentales permettant de retrouver une telle formule se trouvent difficilement pour la pratique (2) et pensons que la formule exponentielle de CHÉNEVEAU et AUDUBERT représente le mieux les faits.

1. KLEINMANN, *Koll. Zeitschr.*, 1920, v. 27, p. 236 et *Bioch. Zeitschr.*, 1919, vol. 99, p. 16.

2. La condition de KLEINMANN ne peut être réalisée dans la pratique car tout colloïde mûrit plus ou moins vite, toute suspension floccule plus ou moins vite ; la réalisation d'une suspension où le grain et le liquide intergranulaire auraient la même densité exactement, sort de la pratique courante et utile.

De plus l'état des particules dispersées, grosseur, formes, répartition, varie avec les concentrations ; MM. BAUDOUIN et BÉNARD écrivent à ce sujet :

« Le fait de disposer d'un éclairage convenable ne suffit pas pour que l'on soit autorisé dans tous les cas à appliquer à l'opacimétrie la formule simple de la colorimétrie, on n'est en droit de le faire qu'autant que l'état des particules dispersées reste indépendant de la concentration, de là l'utilité des courbes d'étalonnage. »

II

PRINCIPES GÉNÉRAUX DE CONSTRUCTIONS POUR LES APPAREILS DESTINÉS AUX MESURES OPTIQUES PAR OPACIMÉTRIE

Après l'exposé qui vient d'être fait sur les propriétés optiques des milieux troubles, on conçoit que les dispositifs destinés à la mesure de ces milieux doivent satisfaire à un certain nombre d'expériences.

1^o Il faut employer une lumière monochromatique, l'absorption n'étant pas la même pour les diverses radiations (1); il est préférable d'avoir une lumière bien définie qui permettra de mettre en œuvre aussi les renseignements mis en évidence par les lois construites en lumière monochromatique.

2^o Choix de la radiation à employer.

Les diverses radiations et leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau ci-dessous (d'après PILOTNIKOFF, EDER, EULER).

Radiations	Vibrations par seconde	Longueur d'onde
De 0,01 μ à 0,01 μ,		Rayons X
100 μ	3.000	Les plus courts rayons U. V.
200 à 400 μ	1.750 à 1.000	(rayons de Schulmann)
400 à 760 μ	400 à 750	Rayons U. V.
760 à 1 μ	350 à 400	Spectre visible
1 μ à 100 μ	100 à 300	Infra rouges
100 μ à 1.000 m.		Rayons caloriques
		Ondes électriques

1. Cf. *loc. cit.*

Pour les dosages par absorption dans les milieux biologiques, le choix de la radiation à employer est de tout premier ordre, ainsi qu'on l'a déjà dit ; il faut employer des faisceaux lumineux de longueur d'onde supérieure à 620 μ ; le mieux est d'employer des filtres WRATTEN étalonnés pour les diverses zones que l'on peut désirer. Voici à titre documentaire un tableau de divers filtres avec radiations obtenues.

Ecrans	Epaisseur	Longueur d'onde en μ
1 ^o Quartz	1cm.	laisse passer les rayons d'une long. d'onde allant jusqu'à 180
2 ^o Acétone à 5 pour cent	0 cm. 5	— 210
3 ^o Viscose.....	0 mm. 06	— 240
4 ^o Verre U. Viol.	3 mm.	— 250
5 ^o Verre.....	0 mm. 14	— 260
6 ^o Acétate de cellulose.....	0 mm. 5	— 270
7 ^o Ecran de Wood (sel) de nitrosodiméthylaniline à 1 pour dix mille.....	1 cm.	— 280
8 ^o Sérum		— 300
9 ^o Verre Euphos.....	0 mm. 75	— 330
10 ^o Ecrans Wratter		Arrêtant les radiations inférieures à 6.

3^o Homogénéité et stabilité.

L'importance de l'homogénéité et de la stabilité est évidente ; il faut que tous les points du milieu dont on mesure l'opalescence soient identiques à la petite surface qui reçoit et absorbe le rayon lumineux incident. Pour arriver à ce résultat, il faut connaître et mettre en œuvre les techniques de manipulation des suspensions ; nous y consacrerons un chapitre spécial.

4^o Faisceaux lumineux parallèles.

Cette question, déjà importante quand le faisceau lumineux arrive sur un milieu trouble fixe, quand l'étalon est un test d'opacité progressive, nécessite un flux dirigé, nettement défini, qui évite les pertes de lumière, élimine les phénomènes de diffusion, réfraction, polarisation.

La diffusion qui se produirait pourrait diminuer la densité optique et augmenter la lumière transmise.

De plus, au point de vue appareillage, si l'on considère un dispositif genre colorimètre DUBOSCQ, où le déplacement des cuves se

fait dans le sens du flux lumineux, une lumière à rayons parallèles est encore plus indispensable. En effet, on peut le montrer par l'expérience suivante connue, qui est une démonstration de la loi de KEPLER sur le carré des distances.

« Eclairons le colorimètre (1) avec le côté mat et dépoli du miroir, ce qui donne une lumière non parallèle, et plaçons 2 disques de verre *dépoli, translucide* et d'égale valeur sur les deux platines des chariots, dont on aura retiré les godets. Si les deux chariots sont à la même hauteur quelle qu'elle soit, les deux plages de l'oculaire seront également grises ; mais, si laissant un des chariots en place, on abaisse l'autre, l'équilibre sera rompu, le verre abaissé apparaîtra plus lumineux que l'autre et cela d'autant plus que la différence de hauteur sera plus grande. Ce phénomène s'explique aisément, chaque élément du miroir mat peut être considéré comme une source lumineuse envoyant un faisceau conique sur les disques translucides. En vertu de la loi de Képler (loi du carré des distances) le disque placé le plus haut sera moins éclairé que le disque placé plus bas.

Il va de soi que ces questions n'interviennent pas si les disques reçoivent par l'intermédiaire du miroir argenté de la lumière provenant d'une source éloignée. Dans ces conditions, la distance de la source aux disques est suffisante pour que la variation introduite par le déplacement de ceux-ci ne joue plus aucun rôle ; c'est ce que l'expérience vérifie.

Ce que l'on vient de dire pour un disque absorbant peut se répéter pour les divers étages d'une suspension.

Mais le fait de disposer d'un éclairage convenable ne suffit pas pour que l'on soit autorisé dans tous les cas à appliquer à l'opacimétrie la formule simple de la colorimétrie, d'après laquelle les concentrations sont inversement proportionnelles aux hauteurs lues sur les verniers ; on n'est en droit de le faire qu'autant que l'état des particules dispersées (gros-seur, formes, répartition) reste indépendant de la concentration.

Dè là l'utilité des courbes d'étalonnage ».

L'exposé des travaux sur les milieux troubles montre que l'on peut mesurer la concentration de tels milieux soit d'après la quantité de lumière qu'ils absorbent (c'est-à-dire qu'ils arrêtent les rayons lumineux parallèles dirigés perpendiculairement au milieu), soit d'après la quantité de lumière qu'ils diffusent ou transmettent, le milieu étant éclairé obliquement, chaque grain devenant un point lumineux, et alors plus le milieu est riche en grains, plus il transmet

1. BAUDOUIN et BÉNARD, *C. R. Soc. biol.*, 4, 19, 22, 454.

de lumière. Ce dernier procédé ne peut s'appliquer sans critiques aux dosages quantitatifs et les lois de l'action de masse d'un flocculum sur un faisceau lumineux, formulées par CHÉNEVEAU et AUDUBERT, retrouvées par VLÈS pour les suspensions de bactéries et par BLOCH et W. RENWICK sur les émulsions d'argent n'en rapportent pas. La lumière diffusée est, en effet, sujette à variation considérable, peu forte si le milieu est fait de gros grains, forte s'il est fait de petits grains régulièrement répartis dans le milieu, ce qui peut inverser les résultats suivant l'état du flocculum. Enfin, la variation de lumière diffusée est moins sensible à la variation de masse en suspension que la variation de lumière transmise dans la mesure par absorption.

Notons que, en dernière analyse, quand l'action d'un flux lumineux de faisceaux parallèles sur un milieu soumis à une mesure quantitative d'absorption est complexe, la diffusion gêne et doit être considérée comme « un parasite ». En effet, si on place un liquide trouble sur le trajet de rayons lumineux parallèles, une partie de la lumière est réfléchi et réfractée en tous sens ; d'autres rayons restent parallèles et traversent le milieu sans déviation.

La lumière déviée par les granules est de la lumière diffusée ; les rayons ainsi déviés, peu inclinés sur l'axe, constituent la lumière diffusée axiale et arrivent avec les rayons parallèles non déviés dans l'œil de l'observateur.

Considérons quelques cas :

1° Suspension à grains très fins, légèrement trouble ; la lumière transmise non déviée est intense ; la lumière diffusée est faible ou sensiblement la même dans toutes les directions (20° à 90° de la direction incidente).

2° Suspension très trouble, grains gros et nombreux ; la plus grande partie des rayons sont déviés, la lumière transmise sans déviation est faible, mais la lumière diffusée est relativement intense, surtout près de l'axe pour un angle voisin de 180° des rayons incidents ; ainsi schématiquement, si le nombre et la grosseur des grains augmentent fortement, la lumière transmise diminue, tandis que la lumière diffusée augmente et inversement.

Actuellement, on trouve un certain nombre d'appareils réalisant les conditions des mesures optiques des milieux troubles ; les uns sont d'un maniement assez délicat, étudiés pour des études et examens en lumière exactement monochromatique, coûtent fort

cher et non construits dans le but pratique que nous nous proposons : l'analyse des composants des humeurs, autant que possible sur de petites quantités de liquide. Ils sont à la portée des physiciens minutieux et avertis. Je citerai le spectrophotomètre différentiel de d'ARSONVAL, le spectrophotomètre de Crova, le photomètre de NUTTING, le spectrophotomètre d'YVON à trois plages (1).

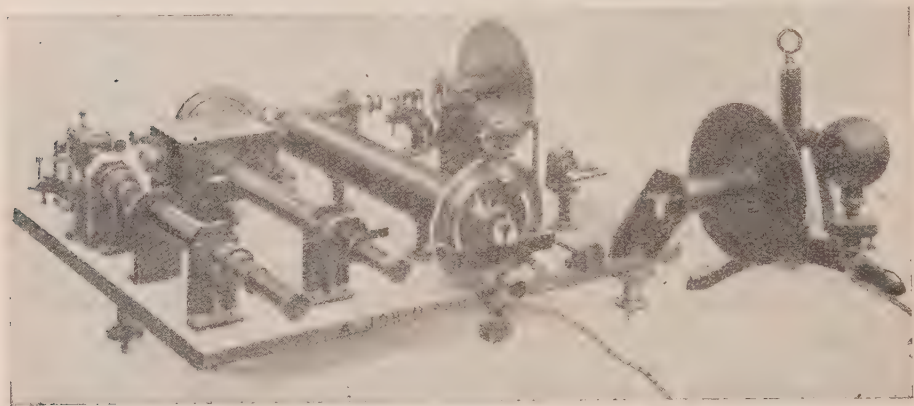


Fig. 7. — Spectrophotomètre d'Yvon.

En voici des descriptions sommaires et des schémas :

Spectrophotomètre différentiel de M. d'Arsonval.

« Il permet de comparer le pouvoir absorbant ou la richesse de deux solutions de même substance.

En effet, si l'on examine au spectroscope un faisceau de lumière blanche ayant traversé une solution colorée, on voit que la lumière a subi une diminution très inégale dans les différentes régions du spectre. En déterminant pour certains points, la valeur de cette absorption on caractérise absolument cette substance au point de ne pouvoir non seulement reconnaître sa présence mais de plus la doser rigoureusement, même dans un mélange de matière colorante.

Ce remarquable procédé d'analyse chimique a été introduit en physiologie par VIERRORDT.

1. Les détails techniques, schéma, clichés, relatifs à ces appareils nous ont été fournis obligeamment par les maisons qui les construisent, les maisons PELLIN, JOUIN de Paris, et Adam HILGER Ltd de Londres, auxquelles nous adressons l'expression de nos plus vifs remerciements.

L'appareil a le triple avantage : 1^o d'être différentiel et de nécessiter, par suite, ni réglage, ni déterminations préalables d'aucune constante ; 2^o de fonctionner sans polarisation comme l'instrument de VIERRORDT ; 3^o enfin de pouvoir s'adapter à tous les spectroscopes existants de façon à les transformer en spectrophotomètres.

La partie spectrophotométrique proprement dite se compose de deux tubes parallèles superposés TT' réunis à leur partie antérieure par une boîte métallique B dans laquelle joue, au moyen d'une vis à filet droit et

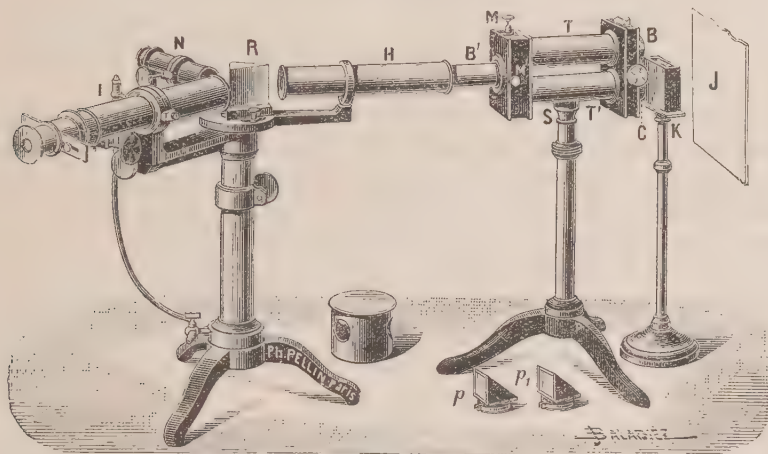


Fig. 8. — Spectrophotomètre de d'ARSONVAL.

gauche, un système de deux volets mobiles VV' qui limitent deux ouvertures rectangulaires de largeur variable en sens inverse, et dont les centres coïncident toujours avec l'axe des tubes TT'.

En face de chaque tube, de l'autre côté des volets mobiles, se trouvent deux lentilles achromatiques semblables LL'. En face de la lentille L' se place la cuve transparente K, contenant la solution colorée qu'on veut analyser.

Les tubes TT' sont réunis à leur extrémité postérieure par une boîte B'' qui porte 2 parallépipèdes transparents P1' réunis suivant une de leurs arêtes. Perpendiculairement à cette arête se trouve la fente F du spectroscope, coïncidant avec le diamètre vertical du tube A. Cette fente est à lèvres mobiles au moyen du bouton M'. Un second bouton M permet d'amener l'arête commune des parallépipèdes P1' à couper la fente du spectroscope en deux parties d'égale hauteur. Une échelle à deux divisions et double vernier donne par une simple lecture le rapport des surfaces que les volets découvrent respectivement sur les lentilles LL'', c'est-à-dire le rapport des quantités de lumière qui tra-

versent à chaque instant respectivement chacun des tubes TT'. Tout le système est fixé sur une colonne F et un pied à trois branches.

On place en A un spectroscopie quelconque dont on a enlevé la fente et dirigeant les lentilles LL' vers une surface uniformément éclairée, une feuille de papier blanc J ; la fente F qui est au foyer principal des lentilles LL' est éclairée, par la lentille L dans sa partie supérieure et par la lentille L' dans sa partie inférieure.

Les volets VV' étant au milieu de leur course, les lentilles LL' sont également découvertes, elles laissent passer les mêmes quantités de lumière et comme tout est symétrique dans l'appareil, on obtient deux spectres également éclairés et parfaitement en contact.

Plaçant en L' la solution colorée, on éteint certaines radiations dans le spectre inférieur. Pour amener l'égalité dans la partie des deux spectres considérés, on isole cette partie au moyen des deux volets de l'oculaire, puis on rétrécit au moyen du bouton C l'ouverture de la lentille L', en augmentant de la même quantité l'ouverture de la lentille L.

Le rapport des intensités lumineuses de la partie analysée des spectres est donné directement et sans calculs par l'échelle à double division.

On voit que la partie essentielle de cet instrument consiste en un double photomètre à lentilles, rendu différentiel et adapté à la place de la fente d'un spectroscopie quelconque.

Pour la physiologie, M. d'ARSONVAL recommande l'emploi d'un spectroscopie à un prisme de 60°. Avec le dispositif figuré ci-dessus, les manipulations sont extrêmement faciles, tous les organes sur lesquels on doit agir étant à la portée de l'opérateur.

On peut aussi adapter en avant des deux lentilles LL' les deux prismes à réflexion totale pp' qui sont mobiles autour d'un axe horizontal, on se sert alors de la lumière directe d'une même flamme en inclinant convenablement l'axe de réflexion des prismes.

Pour comparer deux sources de lumière, on place ces prismes pp' à 180° (1). »

Le photomètre de Nutting.

« La *spectrophotométrie* qui, pour le Chimiste, se résout généralement à la mesure des absorptions d'une substance à différentes longueurs d'onde n'a reçu que dernièrement l'attention qu'elle mérite dans les laboratoires de Chimie. Il suffit pourtant de se rappeler quelques-unes de ses applications pour démontrer la grande importance de cette mesure physique. Sous ce rapport, on peut citer la détermination de l'oxyde de

1. Extrait des *Archives de Physiologie*, janvier 1890.

carbone dans le sang (par VOGEL) et l'isolement du néodyme et du prosodyme (par AUER VON WELSBACH).

En cherchant la cause de cette lacune, nous la trouvons dans la difficulté d'obtenir des résultats précis avec les modèles plus anciens du spectrophotomètre. En consultant la plupart des travaux sur l'application du spectrophotomètre, nous voyons que l'observateur a, ou pris comme exactes les indications de son instrument (supposition trop souvent erronée), ou il a été obligé, avant de commencer ses études, de procéder à une laborieuse recherche préliminaire sur les sources d'erreur.

Le spectrophotomètre de HUFNER, construit par nous depuis 1904, fut étudié en vue des recherches sur les plaques photographiques et pour cet usage a donné beaucoup de satisfaction. Bien qu'utile aussi pour les travaux généraux de la spectrochimie, cet instrument présente dans certains cas plusieurs inconvénients. Lorsque nous avons envisagé l'étude d'un spectrophotomètre destiné à être à la fois commode et précis pour les travaux généraux, nous nous sommes décidés, après avoir examiné les principaux modèles existants, à prendre comme base l'instrument à polarisation décrit par P. G. NUTTING (voir Reprint n° 155, *Bulletin of the Bureau of Standards*), combiné avec notre spectromètre de longueur d'onde, modèle à déviation constante.

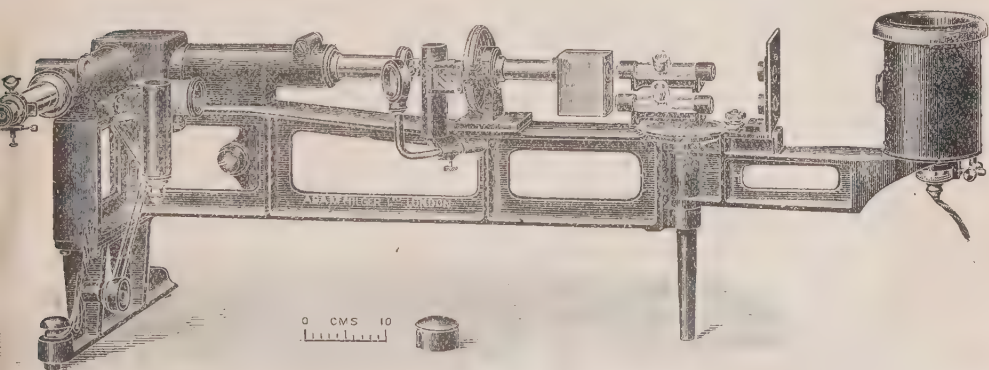


Fig. 9. — Photomètre de Nutting.

Nous avons apporté au modèle primitif des modifications considérables en vue de l'emploi auquel il était destiné, en conservant toutefois la méthode de la division du champ et autres caractéristiques importantes. Toute modification a été l'objet d'un examen approfondi.

Les caractéristiques principales intéressant le manipulateur sont les suivantes :

1^o Une source unique de lumière est employée pour les deux faisceaux.

2° On peut employer les tubes à liquides et à gaz de n'importe quelle longueur.

3° L'écart des faisceaux est grand (38 mm. entre les centres).

4° Le cercle est gradué en « densité » et en degrés.

5° Le photomètre peut s'adapter à n'importe quel spectroscopie bien que notre spectromètre de longueur d'onde soit préférable à cause de sa commodité, sa précision et sa construction rigide.

Il convient d'ajouter que nous avons pris beaucoup de soins à réaliser les meilleures conditions d'éclairement, point de la plus haute importance dans la spectrophotométrie de précision.

Les deux faisceaux émanant de la source de lumière sont rendus parallèles par le dispositif C, sur lequel est gravée la distance correcte de la source. En mesurant l'absorption d'une dissolution, les faisceaux parallèles passent l'un à travers le tube D, contenant le liquide à étudier, l'autre à travers un deuxième tube contenant de préférence le liquide employé comme soldant. Les deux faisceaux pénètrent dans le photomètre par les ouvertures A et B.

Le photomètre fait tomber sur la fente du spectromètre un champ en trois parties dont les deux parties extérieures sont éclairées par la lumière ayant subi l'absorption du liquide à étudier ; l'éclat de la partie centrale du champ peut être réduite en faisant tourner le cercle gradué G.

En regardant dans l'oculaire, on voit par conséquent trois spectres superposés horizontalement dont les deux extérieurs présentent moins d'éclat que celui du milieu du fait de l'absorption du liquide en étude. L'intensité d'éclat du spectre du milieu peut être réduite en faisant tourner le cercle gradué G.

Ayant choisi une longueur d'onde convenable (de préférence en isolant la région intéressante du spectre au moyen d'un oculaire à volets), on tourne le cercle du photomètre jusqu'à ce que l'intensité d'éclat des trois spectres soit égale. L'indication du cercle, divisée par la longueur de la colonne de liquide, donne le « coefficient d'extinction ».

La graduation du cercle ainsi que celle du tambour du spectromètre peuvent être lues commodément par l'observateur sans quitter l'oculaire.

Une loupe L montée sur le photomètre, facilite la lecture du cercle gradué. »

Spectrophotomètre de Crova.

« Cet appareil se compose essentiellement d'un spectroscopie à vision directe avec prisme à grande dispersion MICHEL-JANSSEN. La lunette porte dans son plan focal une fente oculaire dont on peut varier l'écartement et la position. On peut ainsi isoler dans le champ de l'oculaire la partie correspondante des spectres qu'on veut observer. Une vis tangente fait

mouvoir la lunette dans un plan horizontal autour d'un axe vertical passant par le centre de l'objectif. Sa position est déterminée par un vernier qu'elle entraîne devant un secteur gradué fixé au support de l'instrument.

Un mouvement analogue déplace le micromètre et le collimateur qui est éclairé par un petit bec à papillon.

On peut donc graduer le spectrophotomètre en longueur d'onde soit par rapport au secteur gradué avec vernier soit par rapport aux divisions de l'échelle du micromètre.

La fente rectiligne qui porte le collimateur du spectroscope reçoit directement dans sa partie inférieure la lumière fournie par une source et dans sa partie supérieure la lumière fournie par une seconde source lumineuse placée à 90° de la première après qu'elle a traversé le polariseur et un analyseur, composés de deux nicols à faces normales, dis-

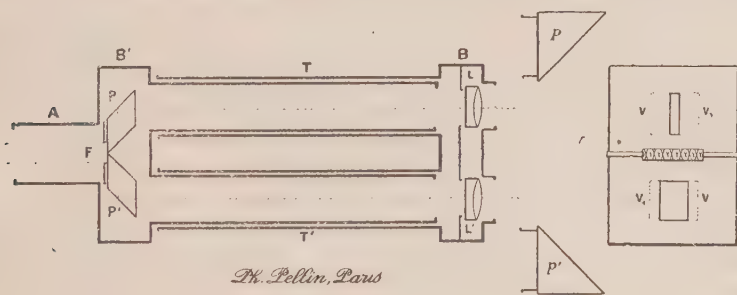


Fig. 10. — Spectrophotomètre de Crova.

posés de telle façon qu'une rotation de 90° doit éteindre un rayon solaire transmis dans le sens de leur axe ; un prisme à double réflexion totale renvoie ce faisceau dans le corps de l'appareil.

Les deux faisceaux traversent le prisme à vision directe et donnent deux spectres superposés parfaitement au contact.

Une rotation convenable de l'analyseur établit l'égalité successive-ment dans les différentes régions du spectre donnant ainsi la valeur relative des éclaircissements ou la valeur de l'absorption que fait éprouver un liquide placé dans le faisceau direct de l'appareil.

Analyse photométrique. — On place la source lumineuse la moins intense devant la demi-fente libre, la lumière la plus intense est seule affaiblie par la rotation de l'analyseur, le rapport des intensités est représenté par la formule :

$$\frac{I}{I'} = \frac{I}{\sin^2 \alpha}$$

dans laquelle $\frac{I}{I'}$ représente le rapport de la lumière la plus intense à

la plus faible ; la sensibilité est variable avec α et atteint son maximum pour $\alpha = 45^\circ$.

On a ainsi les rapports d'intensité des diverses radiations de même longueur d'onde prises dans les spectres des deux sources à comparer.

Analyse photométrique quantitative d'une source lumineuse. — Dans ce cas on prend comme type l'étalon CARCEL disposé sur la balance automatique de manière à ramener les rapports d'intensité à un terme de comparaison invariable.

Analyse chimique quantitative. — On éclaire la demi-fente libre devant laquelle est placée la cuve destinée à recevoir la solution dont on veut mesurer l'absorption et la demi-fente recouverte par le prisme réflecteur par deux lampes à bec d'ARGAND (à couronne de trous) dont les cheminées de verre sont entourées d'un manchon en tôle percé d'une ouverture latérale ; ces deux lampes sont solidaires l'une de l'autre, le gaz leur arrive par un bec bifurqué de sorte que les variations que peut subir sa pression exercent une même influence sur leur pouvoir éclairant. Au moyen d'un robinet adapté à chaque lampe on fait varier l'intensité de l'une d'elles de manière que l'intensité soit la même dans toutes les régions du spectre de la demi-fente qui reçoit la lumière de l'appareil polariseur dont l'alidade est au zéro.

On substitue à l'eau distillée, après le réglage, la solution à analyser, les rotations qui amènent l'égalité d'intensité dans les régions déterminées du spectre donneront, au moyen des formules logarithmiques, le titre de la solution examinée. »

D'autres appareils sont plus spécialement étudiés pour dosage pratique des milieux troubles rencontrés en analyse chimique courante, en chimie biologique ou en sérologie, tels sont le spectrophotomètre de FÉRY, le néphélémètre de CHÉNEVEAU et AUDUBERT, l'opacimètre de VLÈS, le photomètre de VERNES, BRICQ, et YVON, l'appareil de MM. BAUDOUIN ET BÉNARD fonctionnant comme spectrophotomètre.

Parmi ces derniers appareils nous avons utilisé pour notre étude des dosages optiques et la mise au point de techniques de précipitation colloïdale, trois de ces appareils, le spectrophotomètre de FÉRY, le photomètre de VERNES, l'appareil de MM. BAUDOUIN et BÉNARD ; nous allons les étudier en détail, voici seulement quelques caractères de deux appareils susceptibles d'être également utilisés au but que nous nous proposons, le néphélémètre de CHÉNEVEAU et AUDUBERT et l'opacimètre de VLÈS.

« Le néphélémètre de CHÉNEVEAU et AUDUBERT se compose d'une source lumineuse S (lampe opaline) disposée au foyer d'une lentille convergente. L'envoyant un faisceau lumineux homogène et parallèle sur deux fenêtres circulaires F et F' placées à la base d'un double prisme à réflexion totale P. P'. L'œil de l'observateur abrité de toute lumière

parasite, grâce à un écran I, compare les éclaircissements de ces deux fenêtres au moyen d'une lunette A qui en fournit des contiguës. Un écran coloré placé devant la lunette ne laisse passer qu'une partie étroite du spectre. Devant la fenêtre F' est disposé un tube T monté comme un tube de saccharimètre, contenant le milieu trouble à étudier : devant la fenêtre F se trouve un petit coin de verre blanc V disposé en sens inverse de manière à éviter la déviation par réfraction. La lame ainsi formée peut se déplacer devant la fenêtre F ; à cet effet, elle est portée par un cadre mobile qui glisse à l'intérieur d'un cadre fixe au moyen d'une crémaillère et d'un pignon denté que l'observateur fait mouvoir en agissant sur le bouton molleté qui le termine. Le cadre mobile porte un index de repère.

Les déplacements sont mesurés sur une graduation disposée sur le cadre immobile. Pour établir l'égalité des plages lumineuses que l'œil voit dans la lunette A, il suffit de déplacer convenablement le coin de verre à teinte neutre jusqu'à ce que son épaisseur moyenne, ainsi traversée par la lumière, équilibre par son absorption celle du liquide à étudier. »

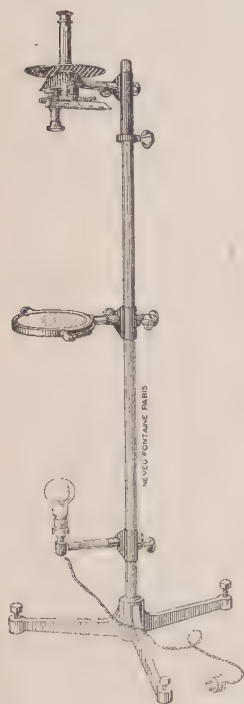


Fig. 11. — Néphélémètre de CHÉNEVEAU.

Quant à l'opacimètre de VLÉS, nous en avons déjà donné les principes, disons seulement qu'il a été récemment perfectionné pour être utilisé non seulement aux dosages des suspensions de bactéries, mais des suspensions d'éléments quelconques.

Les trois appareils choisis correspondent à des besoins et présentent des caractéristiques qui indiquent spécialement leur emploi respectif dans certains cas.

Le spectrophotomètre de FÉRY a été construit dès 1910, son inventeur en donne le but, la genèse et la description :

« Déterminer pour un milieu absorbant, la valeur numérique du coefficient d'absorption et cela pour les radiations comprises dans le spectre lumineux, ce dernier problème semble actuellement le plus important (en spectrophotométrie) et des modèles variés de spectrophotomètres ont été combinés dans ce but.

Ces appareils consistent tous en un spectroscopie auquel est adjoint une partie photométrique permettant d'amener à égalité d'éclairement les plages des deux spectres qui occupent le champ de la lunette d'observation.

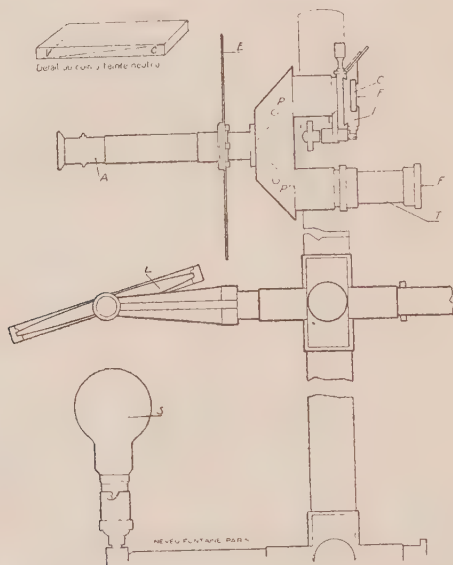


Fig. 12. — Néphélémètre de CHÉNEVEAU.

Dans la plupart des cas, on a recours dans ce but à l'emploi de la polarisation, la loi étant $I \lambda = K \sin^2 \alpha$ où α est l'angle des sections principales du polarisateur et de l'analyseur.

Plus rarement on limite la section du flux lumineux pénétrant dans l'œil, soit en agissant sur la fente (VIERORDT), procédé incorrect, car il compromet la pureté du spectre ou sur des lentilles munies de diagrammes mobiles et de surfaces mesurables (D'ARSONVAL).

Les spectrophotomètres à polarisation sont pour la plupart compliqués et conduisent à une loi d'un usage incommode.

Quant à ceux basés sur l'emploi d'un œil de chat, il est toujours à craindre que l'anneau oculaire (qui est variable comme dimension par suite de la manœuvre de l'œil de chat) ne reste pas inscrit sur la pu-

pille. Ce n'est évidemment que lorsque cette condition est réalisée qu'on peut admettre que les éclaircissements sont réellement proportionnels aux surfaces des diagrammes mobiles.

J'ai pensé que l'emploi du phénomène d'absorption, tout en conduisant à des dispositifs plus simples et moins coûteux que ceux basés sur la polarisation, donnerait aussi une loi simple aux appareils, et en tous cas, fixerait à une valeur invariable la dimension de l'anneau oculaire, image donnée par l'oculaire de l'objectif de la lunette, d'observation. Imaginons, en effet, que devant la fente d'un spectroscope, soient placés 2 prismes P et P' en verre fumé dont les arêtes sont opposées, ces prismes agiront à la fois en absorbant le rayon émis de A et de B et en les déviant; il sera facile de trouver 2 positions des luminaires pour lesquels les anneaux oculaires seront confondus.

Au moment de l'égalité on a :

$$I = I_{Ae} - Kx = I_{Be} - Kx'$$

d'où :

$$\log I_A - Kx = \log I_B - Kx'$$

$$\log \frac{I_A}{I_B} = K(x - x')$$

La valeur K sera déterminée une fois pour toute et les épaisseurs traversées x et x' seront connues par le déplacement d qu'il aura fallu donner aux prismes.

Dans le cas de la mesure de l'absorption des solides ou des solutions, on se servira de 2 lampes A et B identiques.

Sans interposition de la substance inconnue on aura au moment de l'égalité :

$$I = I_{Ae} - Kx = I_{Be} - Kx', \text{ soit } x = x'$$

$$\text{car } I_A = I_B.$$

soit y l'épaisseur de substance introduite et q son coefficient d'absorption, on aura au moment de l'équilibre :

$$I_1 = I_{Ae} - Kx' = I_{Be} - qye - Kx''$$

$$Kx' = Qy + Kx''$$

$$Qy = K(x'' - x')$$

$$Q = R \frac{x'' - x}{y}$$

La valeur de K se mesurera très facilement avec une lame d'épaisseur connue taillée dans la même substance que les prismes.

Dans le cas de la mesure du coefficient d'absorption des solutions, qui est le plus important, comme nous le disions au début, il est facile d'éclairer les 2 prismes absorbants placés devant la fente du spectroscope par une seule source lumineuse.

Pour cela, disposons devant l'appareil une lentille donnant sur la fenêtre l'image de la source S, il est facile de trouver la distance des ouvertures 0 et 0' percées dans un écran disposé devant la lentille pour laquelle les rayons qui convergent sur la fente sont ramenés au parallélisme après passage dans les prismes absorbants P et P'.

La cuve C renfermant le liquide absorbant est disposé devant l'écran E. En réalité il pénètre dans le spectroscope 4 faisceaux ; pour 2 d'entre eux la déviation marginale de la lentille est annulée par celle des prismes, ce sont ces faisceaux qui servent à la mesure ; pour les deux autres les déviations de la lentille et celles dues aux prismes s'ajoutent. Il suffit de donner aux prismes P et P' des angles suffisants, pour que ces faisceaux parasites soient arrêtés par un diaphragme placé dans le collimateur et n'atteignant pas la lunette de ce dernier. »

L'inconvénient de cet appareil est qu'il ne porte pas tout préparé une source lumineuse monochromatique, on sait qu'on peut employer dans ce but divers dispositifs. Nous avons disposé comme source d'une lampe à filament de tungstène et d'un écran WATTEN, qui ne laissent passer que des radiations supérieures à $\lambda = 645, \mu$ ce qui élimine les causes d'erreur et les bandes d'absorption des pigments sanguins, précautions déjà signalées.

On pourrait, suivant les cas, opérer à d'autres longueurs d'onde, notre tableau (1) donnant schématiquement les écrans susceptibles d'être employés.

Un autre inconvénient assez sérieux de cet appareil, c'est sa cuve pour le liquide à examiner; elle est grande, ce qui ne permet pas d'utiliser ces cuves et l'appareil pour les microdosages.

Photomètre Vernes, Bricq, Yvon.

« Le photomètre de MM. VERNES, BRICQ et YVON a été spécialement étudié pour les microdosages dans les liquides biologiques.

« Le photomètre VERNES, BRICQ et YVON pour études d'absorption et de diffusion a pour objet essentiel l'analyse quantitative ou dosage des

corps, à l'aide de mesures reposant sur l'égalité d'éclat de 2 plages photométriques. C'est à la fois un *diaphanomètre* (appareil destiné à l'étude de la lumière transmise ou absorbée) et un *néphélémètre* (appareil destiné à l'étude des nuages ou troubles, etc...) donc de la lumière diffusée).

Il est réalisé spécialement en vue de recherches et déterminations courantes, *très précises* sur des liquides obtenus en faible quantité : sérums humains, liquide céphalo rachidien, corps chimiques rares, etc... Il s'emploie *a fortiori* avec les liquides obtenus en grande quantité. Il convient non seulement pour les liquides (substances absorbantes, floculations, colloïdes précipités), mais encore pour les corps solides dont on veut étudier la transparence.

En conséquence, il a son emploi marqué dans tous les Laboratoires d'analyses chimiques et biologiques (travaux scientifiques divers, service quotidien des Hôpitaux et Cliniques, contrôle des opérations industrielles, répression des fraudes, etc...).

Indépendamment de ses autres qualités, c'est un appareil confortable et de manœuvre facile qui se prête aux mesures en grande série.

Le photomètre VERNES, BRICQ et YVON se distingue du colorimètre par les moyens mis en jeu, moyens théoriques et techniques.

1^o Au lieu de comparer la substance étudiée à une substance-type dont le choix embarrasse souvent l'opérateur, dont les propriétés sont en général mal définies et en outre variables, on la compare à une substance solide, dont les caractéristiques sont parfaitement connues et fixées.

2^o L'appareil repose sur le principe photométrique des flux dirigés dont la mise en œuvre rigoureuse donne à la fois sécurité, précision et sensibilité ; celle-ci est environ 2.000 fois supérieure à celle que donnent les appareils similaires comportant l'emploi d'écrans suffisants.

3^o La très grande sensibilité obtenue donne le double avantage d'augmenter considérablement le champ des mesures d'absorption et de permettre des mesures de diffusion latérale ou axiale, sans avoir recours à des sources lumineuses très intenses.

Des dispositifs spéciaux permettent de passer instantanément de l'absorption à la diffusion. On y utilise un flux lumineux monochromatique. On sait que plusieurs peuvent être envisagés à cet effet.

Premier cas : *Lumière monochromatique unique*. — Il n'y a, dans ce cas, aucune difficulté théorique, mais les sources donnant une telle lumière sont relativement rares et peu intenses (brûleur au sodium, par exemple, utilisé pour la Polarimétrie).

Deuxième cas : *Lumière monochromatique spectrale*. — Ce cas suppose qu'au photomètre est adjoint un dispositif spectroscopique. On a

alors un spectrophotomètre, appareil différent de celui qui est décrit ici et sensiblement plus coûteux ; un tel appareil présente l'intérêt de se prêter tout particulièrement à l'analyse quantitative des corps, par l'étude de leur coefficient d'absorption en fonction de la longueur d'onde.

Troisième cas : *Lumière blanche totale*. — La difficulté naît de ce que, pour être précises et même seulement exécutables, les mesures photométriques ordinaires par égalisation des éclats de deux plages exigent que ces plages soient sensiblement de même couleur. Il faut en conséquence, pour utiliser la lumière blanche totale dans de bonnes conditions, que la substance examinée et la substance de comparaison aient à très peu de chose près le même spectre d'absorption : si la substance de comparaison est, comme ici, un verre ou une gélatine neutres, on peut faire des mesures sur la substance comprise dans la gamme des gris ; si l'on s'imposait d'examiner seulement des substances déterminées comme des mélasses, on prendrait comme substance de comparaison un verre teinté de la même façon, ainsi que l'a fait JOSSE.

L'emploi systématique de la lumière blanche totale dans tous les cas n'est possible qu'avec un tout autre appareil, le photomètre hétérochrome, reposant sur un principe différent. Celui-ci permet de résoudre des problèmes tels que celui-ci : quelle est l'absorption totale d'un verre coloré, jaune par exemple, destiné à des lorgnons, autrement dit quelle sera la réduction pratique de l'intensité lumineuse pour celui qui regardera avec de tels verres, soit un paysage éclairé par la lumière solaire, soit un papier éclairé par la lumière électrique ?

Quatrième cas : *Lumière blanche filtrée par un écran*. — Le filtre a pour effet de monochromatiser la lumière d'une façon approximative et ramène ainsi au premier cas, il n'y a alors aucune difficulté : c'est ce dispositif, qui est utilisé dans le photomètre VERNES, BRICQ, YVON.

Le principe photométrique général mis en œuvre est celui du photomètre VERNES et BRICQ, type E : « Deux faisceaux lumineux d'égale intensité aboutissent dans une lunette d'observation où ils donnent deux plages lumineuses contiguës. Si l'on place sur le trajet d'un des faisceaux un liquide qui contient un précipité en suspension, il se produit une absorption de lumière qui est fonction du poids de précipité en suspension, et qui se traduit dans la lunette d'observation par une réduction de l'éclat de la plage correspondante ; un dispositif permet d'affaiblir l'autre faisceau de façon à réduire l'éclat de la deuxième plage jusqu'à égalité avec la première. Ce dispositif affaiblisseur (compensateur) est un coin de gélatine fumée dont l'absorption croît avec l'épaisseur et dont le déplacement est réperé par une échelle.

La disposition du nouveau modèle de photomètre permet de diriger

la lumière issue de la source de telle façon que la cuve et le coin photométrique soient traversés par des faisceaux de lumière parallèle, et que ceux-ci viennent converger et donner chacun une image de la source, en un point où se place l'œil de l'observateur. La superposition des images en ce point est essentielle pour assurer l'exactitude des mesures, rend les lectures indépendantes de la place de l'œil devant l'oculaire. La convergence des faisceaux à l'entrée de l'œil évite les pertes de lumière et permet de recevoir sur la rétine tout le flux émergeant de l'objectif collimateur au foyer duquel se trouve la lampe, ce flux ne subissant, dans sa partie utile, d'autres pertes que celles dues aux absorbants interposés.

Les images du filament se formant approximativement au niveau de la pupille ne peuvent être perçues ; l'œil accommode à travers le viseur V à la distance normale sur le milieu du cube C ; la section du flux en cet endroit constitue les plages d'observation.

Le champ lumineux apparaît composé d'une bande centrale, qui est éclairée par le faisceau ayant traversé le coin compensateur et de deux plages latérales qui, elles, sont éclairées par le faisceau issu de la cuve. Aucune image nette du filament n'est visible pour l'observateur, la section du flux dans le voisinage du cube est homogène pour chaque faisceau.

L'appréciation des plus petites différences d'éclairement des plages ne peut se faire que si les deux faisceaux ont exactement la même nuance ; comme il n'existe pas de sources lumineuses monochromatiques commodés, on a fait usage de lumière blanche filtrée. Tout en employant une source lumineuse relativement faible on a pu, grâce à la disposition optique de l'appareil qui fait converger dans l'œil une forte quantité de lumière, employer des filtres rouge foncé (Wratten, filtre n° 70) qui ne laissent passer que les radiations de longueur d'onde supérieure à 650μ . La lumière utilisée se trouve ainsi tout entière en dehors des régions du spectre où les pigments sanguins, l'hémoglobine et ses dérivés sont susceptibles de donner des bandes d'absorption.

Une lampe de bas voltage (8 volts 25 bougies) placée au foyer d'un objectif collimateur O 1 donne un faisceau de rayons parallèles. La moitié de ce faisceau après réflexion à 90° par le prisme pentagonal (équerre optique) P₁ traverse la cuve d'absorption X, subit une réflexion totale dans le prisme T₁ traverse sans déviation le cube C formé de deux prismes triangulaires collés par leur face hypoténuse dont l'une porte en son milieu une bande argentée. L'autre moitié du faisceau lumineux tra-

1. L'objectif O³ qui peut s'introduire entre le prisme T₁ et le cube C et le système diffuseur D₁ qui peut se placer dans l'axe optique entre O₁ et R n'interviennent que dans les mesures de diffusion.

verse le compensateur formé des prismes de gélatine fumée R et N, il est réfléchi à 90° et vient tomber sur le miroir du cube C qui substitue exactement à une partie du faisceau de la cuve sur une largeur égale du faisceau du compensateur. Le coin photométrique N et l'échelle graduée E qui en est solidaire, se déplacent au moyen d'un bouton placé sous la boîte ; un index fixe donne, sur l'échelle, la densité optique du compensateur à l'endroit traversé par le faisceau ; R est un coin de même angle que N, mais disposé en sens inverse ; l'ensemble N et R constitue une lame à faces parallèles qui ne dévie pas les rayons lumineux et dont l'absorption est la même d'un bord à l'autre, ce qui assure l'homogénéité de la plage centrale. Le contrecoin R permet en outre la rectification des indications de l'échelle ; à cet effet, il peut être déplacé d'un mouvement lent au moyen d'une vis et d'une clé à carré.

A partir du cube C les deux faisceaux suivent le même parcours, encastés l'un dans l'autre ; l'objectif O4 a son foyer sur la glace H où il donne une première image de la source (1), reprise par le viseur V qui, à son tour, en donne une seconde sur la pupille.

Le viseur V est formé d'un corps portant un objectif O5 et d'un oculaire ; il est destiné à l'observation des plages ; le corps doit être poussé à fond dans l'appareil ; l'oculaire peut être déplacé plus ou moins pour permettre la mise au point sur les lignes de séparation des plages d'observation. Un diaphragme placé à l'intérieur du viseur limite le champ.

En K, à l'extrémité du viseur, se trouve un diaphragme de deux millimètres portant le filtre coloré (Wratten n° 70) qui peut être remplacé par un diaphragme de 8 mm. muni d'un filtre Wratten F pour les mesures de diffusion.

Là deux faisceaux traversent en G et D des écrans de gélatine fumée, homogènes (surcharges), que l'on peut changer ou enlever à volonté au moyen des boutons placés sur le devant de l'appareil.

L'échelle E du coin N, graduée en densité optique, est chiffré en dixièmes et les petites divisions expriment les centièmes.

L'étalonnage a été fait pour le filtre de Wratten (employé avec le même diaphragme de 2 mm. pour les mesures courantes) avec la lampe à filament de tungstène, fonctionnant à son voltage normal de 8 volts ; les indications de densité de l'échelle ne sont valables que dans ces conditions. Chaque appareil est muni d'un tableau donnant pour les filtres Wratten la valeur des surcharges A et B placées sur les deux faisceaux ainsi que le coefficient de partage, par lequel il faut multiplier les indications de l'échelle, quand on utilise le verre F.

1. Cette première image examinée au moyen de la loupe L, introduite à la place du viseur V, servira au réglage.

La graduation est éclairée par une petite lampe de 3 volts $1/2$ et observée avec la loupe L.

Le photomètre est soigneusement réglé par le constructeur et pour plus de sûreté les prismes et le cube sont collés sur leur support ; cependant, il peut se faire aussi qu'après un certain temps de service il soit devenu nécessaire de démonter les verres pour les nettoyer ; nous donnons ci-après les renseignements indispensables pour permettre de rétablir le réglage primitif, en supposant toutes les pièces dérégées ou décollées.

Le réglage doit réaliser la conjugaison dans l'œil des images de la source lumineuse et permettre des lectures exactes et faciles. Pour arriver à ce résultat il faudra :

a) Amener les deux images du filament à se former dans le plan de la glace H.

b) Superposer ces images au centre d'un cercle noir tracé sur la glace H.

c) Réaliser l'homogénéité parfaite des plages d'observation.

d) Enfin accorder les indications de l'échelle avec les valeurs connues des surcharges.

On commence par donner aux prismes T_1 , T_2 , P_1 , P_e , et au cube C la position indiquée sur leur support par des traits de repère. Pour le cube et le prisme T dont les supports sont montés sur pivot et possèdent en outre le mouvement de bascule, il faut les amener au moyen des vis de réglage dans une position moyenne (position théorique indiquée par le schéma).

La lampe se déplace verticalement, en montant ou descendant la tige qui la porte, après avoir desserré l'écrou inférieur qui fixe cette tige ; celle-ci peut encore basculer dans deux directions rectangulaires en agissant sur deux vis calantes qui soulèvent un plateau perpendiculairement à l'axe optique (1), puis au moyen des mouvements de réglage, le centrer sur la glace d'entrée, il se trouve ainsi sur l'axe optique sensiblement au foyer de l'objectif collimateur O_1 : le faisceau lumineux doit alors projeter l'ouverture libre de l'étoile portant les surcharges G, sur l'ouverture du contre-coin R placé à mi-course.

Les prismes pentagonaux P_1 et P_2 (l'équerre optique) ont la propriété de réfléchir la lumière à 90° de la direction incidente, quelle que soit leur position ; leur réglage ou direction horizontale est donc facile avec les traits de repère.

La lampe et les prismes pentagonaux étant réglés, le faisceau de droite $P_1 T_1$ doit projeter l'ouverture du porte-cuve à mi-hauteur du prisme T_1 , et le faisceau de gauche $P_2 C$ doit couvrir la face d'entrée du

cube, ce dont on s'assure avec un morceau de papier que l'on place aux points indiqués.

Après avoir intercepté l'image de gauche, centrer le faisceau de droite sur l'objectif O_4 en agissant sur les boutons de réglage du prisme T_1 ; toutefois ne faire exécuter à la plate-forme que des petits mouvements horizontaux car la cuve doit rester sensiblement perpendiculaire au faisceau ; s'il est nécessaire, agir directement sur le prisme T_1 après avoir suffisamment desserré la barrette de fixation pour le faire tourner à la main.

Amener, en faisant tourner le prisme T_2 sur lui-même, l'image fournie par l'objectif O_4 au centre de la glace H.

Intercepter le faisceau de droite et déplacer le cube à l'aide des boutons extérieurs jusqu'à ce que l'image de gauche soit, elle aussi, au centre de la glace H.

On peut contrôler ces réglages sans avoir besoin de mettre l'œil à la lunette, au moyen d'un papier blanc placé sur l'objectif O_4 : la partie argentée du cube doit se projeter au milieu du faisceau lumineux de droite à la place même de la partie du faisceau de gauche, ce que l'on contrôle en plaçant le papier sur la paroi de la boîte derrière le cube.

Placer la loupe L qui sert à la lecture de la graduation à la place du viseur H, mettre au point sur l'anneau gravé sur la glace H, amener les deux images au centre du cercle de réglage et les superposer exactement en agissant légèrement sur la lampe et sur le cube. Si toutefois les images ne sont pas nettes, alors que la loupe est au moins sur le cercle de réglage, il faut faire coulisser l'objectif O_4 dans sa monture (après avoir desserré la petite vis qui le maintient) jusqu'à ce que les images de la source soient au point en même temps que le cercle. Lorsque l'on fait tourner l'objectif O_4 sur lui-même les images se déplacent sur la glace H, cela peut servir dans une certaine mesure, au réglage en direction des faisceaux.

Replacer le viseur V, le faire tourner sur lui-même si cela est nécessaire pour amener la bande verticale à se trouver au milieu du champ, mettre au point les lignes de séparation des plages en déplaçant l'oculaire (1). Si le réglage a été bien conduit, les plages correspondant à chacun des faisceaux seront parfaitement homogènes ; s'il n'en est pas ainsi, il convient de vérifier le réglage et de le retoucher en se rappelant qu'un déplacement de la lampe nécessite un nouveau centrage des filaments sur la glace H, et que les pièces optiques doivent occuper une position voisine de celle qui est fixée par le constructeur.

1. Le diaphragme intérieur du viseur doit être au point en même temps que les lignes de séparation des plages ; on peut le déplacer pour le régler, il n'est maintenu que par frottement.

Le réglage tel qu'il vient d'être exposé est commun aux deux sortes de mesures que l'appareil permet d'effectuer, il suffit pour les mesures en lumière transmise ; quant aux mesures de diffusion, elles nécessitent le réglage de quelques pièces optiques qui leur sont spéciales.

La plateforme mobile (prisme T_1) étant dans la position indiquée par le schéma, placer dans son logement la cuve contenant le liquide à examiner ; introduire à droite, ou à gauche, si cela est nécessaire, la surcharge convenable pour qu'il soit possible d'obtenir l'égalité des plages en manœuvrant le coin photométrique.

L'égalité des plages réalisée, lire la graduation ; soit N la lecture ; ajouter la densité g de la surcharge de gauche, ou retrancher la densité d de celle de droite ; on obtient ainsi la densité optique Y de la cuve pleine du liquide en examen.

La formule générale est :

$$Y = N \pm g - d$$

mais l'une des deux surcharges g ou d est nulle dans les lectures courantes. »

Ainsi les avantages pratiques de cet appareil résident dans une source lumineuse monochromatique bien disposée et spécialement étudiée pour les dosages biologiques, dans une cuve petite pour microdosages, un dispositif de plages bien sensible permettant de bonnes mesures, c'est un appareil parfait pour les mesures biologiques. Il est de plus en plus utilisé dans les laboratoires de biologie, c'est pourquoi nous l'avons étudié pour les dosages chimiques et poursuivons depuis longtemps notre étude de précipitation élective et des dosages optiques des constituants des humeurs avec cet appareil.

Les courbes d'absorption que nous avons construites l'étalonnent pour les principes immédiats utiles à doser les liquides biologiques et étendent son champ d'action à la biochimie et à l'exploration clinique.

Un appareil plus modeste est l'appareil de MM. BAUDOUIN et BÉNARD, c'est un microcolorimètre de DUBOSCQ spécialement utile en analyse clinique ; cet appareil porte un spectroscope et peut fonctionner comme spectrophotomètre ; une des cuves du statif DUBOSCQ est disposée pour contenir le liquide étalon, l'autre le liquide à examiner. Au lieu d'un liquide étalon, nous avons utilisé un écran CHANCEL également opaque pour les diverses longueurs

d'onde et nous avons établi des courbes d'absorption des constituants des liquides biologiques, avec cet écran comme étalon ; on écarte ainsi les causes d'erreur déjà signalées dues au précipité étalon à nombre et diamètre de grains différents du terme à analyser, et simplifie la manipulation, le résultat étant donné rapidement par la courbe construite. Cependant, les résultats sont moins précis que ceux obtenus avec le photomètre VERNES, BRICQ et YVON, et, on le conçoit, la radiation où l'on opère limitée par un dispo-

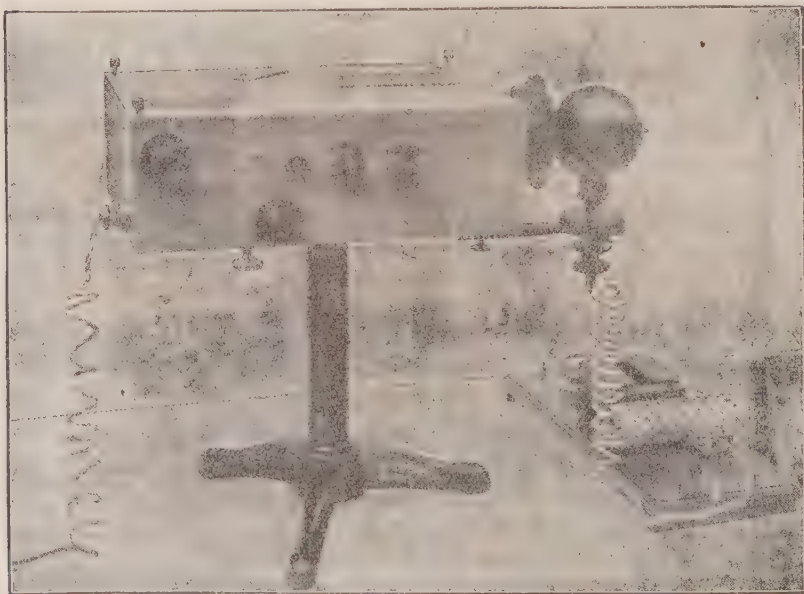


Fig. 13. — Photomètre VERNES, BRICQ, YVON.

siti à glissière contient des parasites ; une couche de suspension trop haute introduit des causes d'erreur (diffusion lumineuse, parasites autour des cuves et dans les cuves), de plus l'extinction n'est pas nette, il y a une « marge » ; le dispositif à crémaillère est peu sensible, un peu lourd. L'appareil de MM. BAUDOUIN et BÉNARD reste cependant un appareil commode et à utilisation nombreuse, c'est pour cela que nous l'avons avantageusement utilisé et étendu son emploi vers une technique facile et commode pour l'opacimétrie.

Une objection ayant été faite à l'emploi de ces appareils, je veux

dire leur prix relativement élevé, nous avons cherché nous-mêmes un dispositif simple soumis aux lois des mesures optiques et permettant des dosages sur de petites quantités de liquide, nous avons construit avec le concours des Etablissements COGIT un dispositif simple : la source lumineuse est constituée par une petite lampe à filament de tungstène donnant un flux lumineux monochromatisé par un écran WATTEN, le flux est bifurqué en deux faisceaux l'un dirigé sur un coin photométrique à teinte neutre, l'autre dirigé

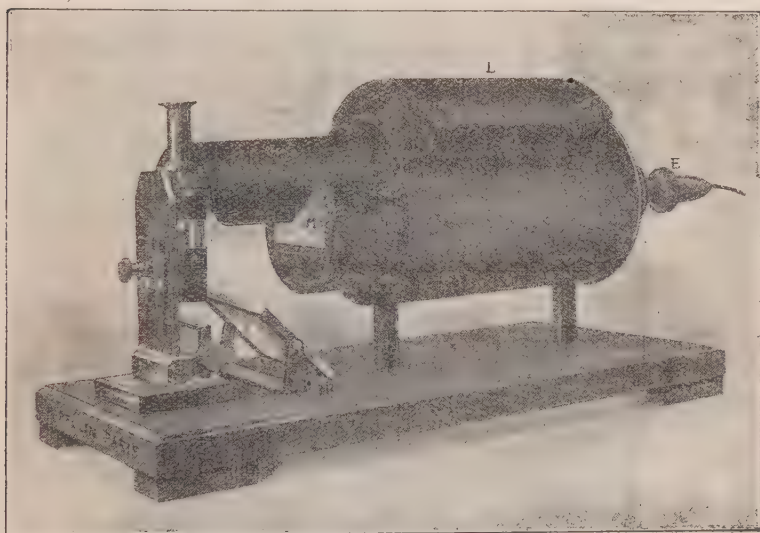


Fig. 14. — Appareil BAUDOUIN et BÉNARD.

sur un tube contenant la suspension à doser, la lumière absorbée des deux faisceaux est rassemblée dans une lunette par un dispositif approprié.

Ce petit appareil peut également fonctionner comme colorimètre en lumière monochromatique ou en lumière blanche, le test étalon étant un coin en verre de couleur approprié ; il peut également mesurer le P_H par colorimétrie ; en effet, considérons un colorant pour P_H , par exemple le bleu de bromothymol dont la teinte utile dans la mesure du P_H va du bleu pour les P_H aux environs de 7, 7,6, au jaune pour les P_H aux environs de 6 ; si on considère une série de tubes P_H 6,2 par exemple à 7,6 leur couleur résulte d'un mélange

de bleu et de jaune vers les PH acides, aussi est-il possible de réaliser une telle gamme avec deux coins l'un bleu, l'autre jaune : accolés suivant leur hypothénuse, ils donnent toute la gamme de couleurs. Nous avons pratiquement réalisé ces coins, nous avons étudié aussi la possibilité d'un bloc à trois couleurs, permettant de réaliser toutes les couleurs.

Ce petit appareil a son emploi dans les laboratoires de clinique, les

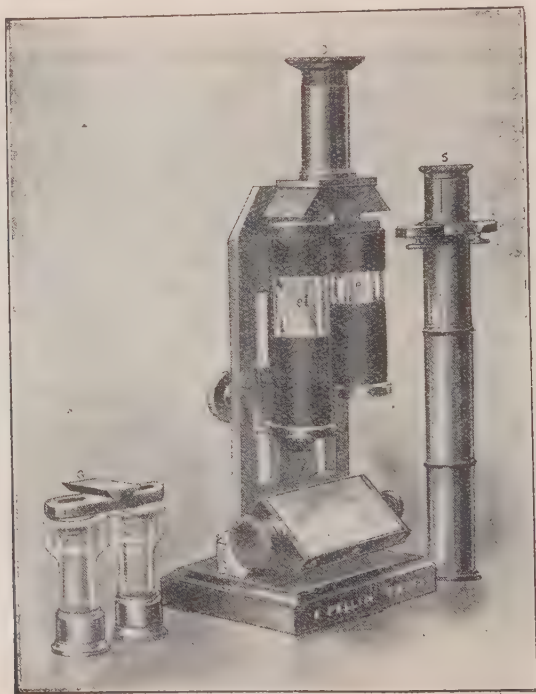


Fig. 15. — Appareil BAUDOUIN et BÉNARD.

laboratoires de manipulations, dans les écoles et facultés, chez le chimiste, chez le médecin biologique.

Nous avons étudié avec cet appareil la stabilité des suspensions mais le fait de disposer d'un éclairage convenable ne suffit pas pour que l'on soit autorisé dans tous les cas à appliquer à l'opacimétrie la formule simple de la colorimétrie d'après lesquelles les concentrations sont inversement proportionnelles aux hauteurs lues sur les verniers; on n'est en droit de le faire que lorsque l'état des parti-

cules dispersées (grosseurs, formes, répartitions) reste indépendant de la concentration. Les courbes d'étalonnage sont donc indispensables.

Les courbes obtenues dans les mesures optiques des précipités obtenus avec les principes pris dans les conditions de concentrations où l'on opère avec les liquides biologiques, permettront de doser rapidement ces éléments dans des conditions étudiées et définies et avec une approximation connue après de longs travaux. Les conditions que nous avons déterminées tendent à remplir l'idéal des lois et théories établies par les savants dont les noms ont été souvent cités plus haut, les facteurs variables ont été éliminés, les techniques d'analyse microchimiques surtout utiles en biochimie et en analyse chimique ont été établies et adaptées aux appareils employés, dont l'emploi plus spécial aux microdosages ou dosages, selon les cas, a été signalé.

CONCLUSIONS

L'étude et la mise au point de la question du dosage optique après floculation, des éléments des liquides biologiques, apporte surtout un élément pratique nouveau dans la microanalyse biologique optique ; déjà récemment ont parus les travaux de M. R. DOURIS sur la floculation des liquides syphilitiques avec des réactifs chimiques purs, domaine où ont aussi travaillé VERNES et BRICQ, LANGE, SACCHI et GÉORGI.

La microanalyse et l'analyse biologique ont à gagner dans les méthodes optiques de mesures ; il n'est pas plus difficile de réaliser une égalité de deux plages lumineuses, colorées ou non, que d'apprécier le virage d'un réactif colorant dans la méthode d'analyse volumétrique ; le facteur personnel existe dans les deux cas, apportant son pourcentage d'erreur. Notons à ce sujet que pour supprimer le facteur d'erreur personnelle M. RIMATTÉI (1) a mis au point la néphélémétrie photographique dans laquelle la lumière transmise par le milieu trouble vient impressionner une plaque photographique que l'on compare à une plaque étalon ; cependant,

1. RIMATTÉI (F.), thèse Fac. pharmacie, juin 1929. Paris ; RIMATTÉI (F.), *Journal de Pharmacie et Chimie*, 16 juillet 1929.

la solution du problème n'est que reculée. La solution idéale serait le calcul des opacités en utilisant les formules citées ; mais les résultats du calcul sont toujours incomplets et nécessitent une mesure ou au moins une estimation moyenne des données théoriques nécessaires (grosseur des grains, etc...) Aussi, pensons-nous, doit-on, s'efforcer de réaliser des mesures précises des opacités avec les appareils répondant aux desiderata de la méthode et sur des milieux stables, homogènes ; les techniques des manipulations des suspensions colloïdales sont les plus aptes à l'obtention de tels milieux.

Chapitre III

STATIQUE DES COLLOIDES TECHNIQUE DE MANIPULATION DES SUSPENSIONS COLLOIDALES

MODE DE PRÉCIPITATION EN VUE DE L'OBTENTION D'UNE SUSPENSION HOMOGÈNE ET STABLE A GRAINS FINS

Les lois relatives aux milieux troubles précédemment exposées, mettent en relief, d'une part, l'importance du diamètre et du nombre de grains, facteurs directement en relation avec l'exposant n de la longueur d'onde, et donc avec l'intensité de la lumière diffusée, et d'autre part, l'importance de la répartition de ces grains soumis pour dosage, au pinceau lumineux. Elles montrent bien qu'il faut prendre des soins particuliers et régler des techniques spéciales dans la précipitation de ces grains, dans leur répartition dans le milieu à examiner, dans la texture du milieu, dans la nature du liquide intergranulaire qui sera le principal élément assurant par sa nature (viscosité, tension superficielle, degré de dispersion, charge électrique, composition chimique) l'homogénéité et la stabilité du milieu à examiner (1).

1. Citons, à ce sujet, un passage de OSTWALD : « L'expérience et la théorie affirment que l'opacité est maximum pour une dispersion moyenne de la phase granulaire, le maximum ne se trouve pas dans le domaine des colloïdes, mais dans celui des dispersions grossières : on met un hydrosol de mastic, de trisulfure d'As, ou d'As dans 2 bechers et l'on ajoute à l'un quelques gouttes de HCl ou de BaCl₂ si l'on compare l'intensité du trouble, on trouve que le système en voie de floculation présente une plus grande opacité. »

De plus si on envisage spécialement l'absorption de la lumière par un milieu trouble, et la loi reliant la masse totale des grains à l'absorption (qui est à la base de l'analyse quantitative de tels milieux préconisés par CHÉNEVEAU et AUDUBERT (1) VLÈS, (2) BLOCK et RENWIK) (3), on conçoit aisément que pour doser l'opacité d'un milieu trouble il faut que ce milieu soit homogène, stable (4), que le liquide intergranulaire soit de constitution bien définie et de propriétés physiques également définies.

Enfin, il est bon de rappeler que c'est sur des suspensions parfaitement stables, de constitutions bien définies, au point de vue grain et liquide intergranulaire qu'ont été établies et étudiées les diverses lois relatives à la spectrophotométrie que nous avons exposées. Ce sont ces raisons qui nous ont porté à appliquer les méthodes de précipitation colloïdale et les lois de la statique colloïdale à nos préparations pour dosage photométrique des constituants des liquides biologiques. De plus, les suspensions à grains fins et en général les préparations colloïdales stables, ont au point de vue analytique un intérêt primordial ; en effet :

1^o Un précipité continuera d'être perceptible pour une richesse en grain faible, si le grain qui le constitue est très fin ; et un tel précipité sera encore dosable au photomètre, pour de très faibles concentrations en petits grains insolubilisés, ce fait ayant une importance primordiale pour réaliser des microdosages qui constituent la principale application de l'opacimétrie par les photomètres à lumière monochromatique et les spectrophotomètres.

Et enfin, d'après les notions générales d'analyse chimique, il nous est possible de dire que :

2^o Un précipité se sédimentera d'autant moins vite qu'il sera fait de grains plus fins ; ainsi un précipité très fin de soufre (matière amorphe) sédimentera mal, et on le fait bouillir pour rassembler les grains et décanter ou filtrer ; de même pour le précipité de sulfate de baryum (qui lui est cristallin).

En effet, chaque grain fin ayant un poids très faible aura peu de tendance à précipiter.

1. *Loc. cit.*

2. *Loc. cit.*

3. *Loc. cit.*

4. Ceci est évident, une suspension dont les grains sédimentent ne représente pas un test d'opacité constante à l'instant considéré.

Mais tout d'abord quels sont les caractères généraux des colloïdes et les classes établies dans ce qu'on appelle (souvent trop largement) « des colloïdes ».

Schématiquement, on peut considérer l'état colloïdal vrai ou dispersion micellaire comme intermédiaire entre les dispersions moléculaires ou solutions et les dispersions mécaniques ou suspensions qui le suivent.

Les caractéristiques de l'état colloïdal vrai sont :

A. — La grosseur du grain ou grandeur des micelles inférieures à $0\ \mu\ 1$, ce qui correspond à la visibilité extrême au microscope. Citons des mesures de grain d'or colloïdal rouge de $17\ \mu\mu$ par ZIGMOUDY, de chlorure d'argent de $0\ \mu\ 08$.

B. — L'absence de diffusion.

C. — Passage à travers les filtres ordinaires.

D. — Phénomène de TYNDALL.

Il consiste dans l'apparition d'un trouble marquant le passage d'un rayon lumineux à travers une solution colloïdale. Il est dû à ce que d'une part les micelles et le liquide intermicellaire n'ont pas le même indice de réfraction et d'autre part à ce que la grandeur des micelles est inférieure à la longueur d'onde.

E. — Structure colloïdale. Petits points lumineux, animés d'un mouvement vif, visibles à l'ultra-microscope, baignant dans un liquide optiquement vide.

F. — Mouvement brownien. Il est aussi l'apanage des suspensions fines et des sels colloïdaux. Il diminue par la dilution et l'augmentation de viscosité du milieu, il augmente avec la température; il a été étudié en France, par GUY, PERRIN, Victor HENRI, LECOQ.

G. — Charge électrique. La micelle a une charge électrique, qu'on peut prouver par l'électrophorèse.

H. — Absence des réactions chimiques caractéristiques pour élément dispersé, et la différence nette du spectre d'absorption.

Les suspensions diffèrent des colloïdes vraies par la grosseur de leur grain, et par la viscosité du milieu intergranulaire, principal facteur de leur existence; elles possèdent aussi les propriétés de non diffusion, non filtration simple, phénomène de TYNDALL, mouvement brownien, charge électrique.

Dans les milieux troubles dont il est question dans ce travail,

nous retrouvons chacune des diverses classes de colloïdes mentionnées ci-dessus ; cependant, seul l'état présenté par les milieux au moment de la mesure optique intéresse surtout, je veux dire les suspensions colloïdales, et ce sont elles que nous étudierons spécialement ici ; c'est l'obtention d'une suspension stable de grains fins dans un milieu chimiquement et physiquement défini que nous recherchons toujours.

En effet, l'état colloïdal vrai à fines particules de l'ordre de moins de $0\mu 1$ présentant les diverses propriétés du milieu colloïdal, absence de diffusion, ultrafiltration, absence de dialyse, mouvement brownien, structure colloïdale, phénomène de TYNDALL, charge électrique (absence de réaction chimique), se trouve réalisé dans certaines de nos préparations, ainsi le précipité de chlorure d'argent à l'état initial et, en milieu très dilué en chlorure, le précipité de chlorure mercurieux à l'état initial et en solutions très diluées.

L'état colloïdal à particules plus grosses de l'ordre de 5μ à 25μ transitoire entre l'état colloïdal vrai et l'état de suspension se retrouve aussi avec les préparations d'urate cuivreux, le complexe d'acétone mercurique par le réactif de NESSLER.

Cependant, ces préparations « mûrissent » assez vite dans les conditions de concentration où il faut pratiquement faire les dosages ; si nous considérons, en effet, le chlorure d'argent précipité suivant notre technique avec par centimètre $0\text{ cm}^3 10$ d'une solution de nitrate d'argent à $0\text{ gr. }10$ pour mille : on a un précipité présentant à l'ultramicroscope l'état colloïdal vrai, grandeur micellaire, mouvement brownien, etc. Ce qui d'ailleurs, n'a rien de remarquable à ces concentrations. En effet, OSTWALD (1) indique pour la préparation d'un hydrosol de chlorure d'argent :

« On ajoute à 100 cm^3 d'eau, 2 à 3 cm^3 d'une solution O, I, N de K cl en agitant énergiquement. On introduit ensuite 1 cm^3 à 2 cm^3 d'une solution décimale de No^3Ag — il se forme de l'hydrosol blanc laiteux. »

Mais au bout de 2 minutes, les grains grossissent peu à peu, restent stationnaires deux minutes environ puis grossissent vite ; les microphotographies ci-jointes (2) en font foi et l'on peut suivre au

1. OSTWALD, *Manipulation des colloïdes*, trad. française.

2. Je prie M. le Dr Aug. LUMIÈRE de vouloir bien agréer ici mes remerciements pour les précieux conseils qu'il m'a donnés pour la microphotographie des grains fins.

photomètre la marche du phénomène ainsi qu'il le sera indiqué.

Ce mûrissement vers un état de particules qui se rassemblent, grossissent, puis vers la sédimentation, se retrouve dans toutes préparations à grains fins, à caractère colloïdal.

Il en est de même pour la préparation d'urate cuivreux, ou celle du complexe acétone mercurique dont on voit ci-dessous les microphotographies typiques.

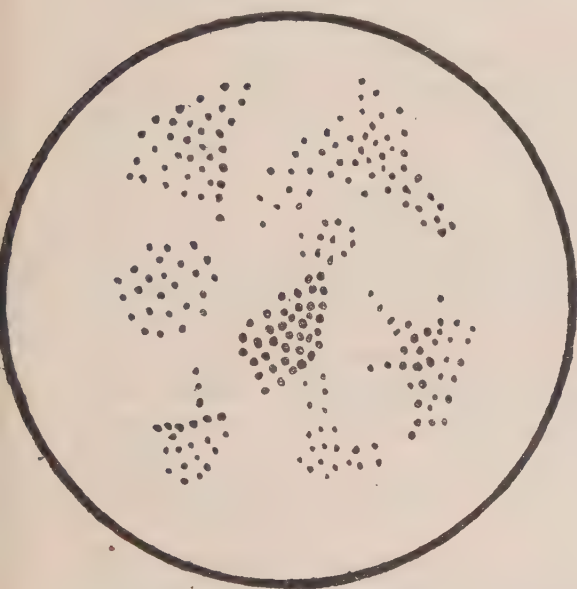


Fig. 16. — Urate cuivreux.

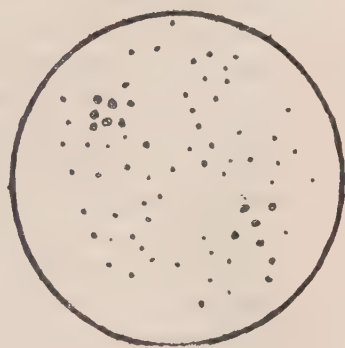


Fig. 17. — Précipité
par le R. de NESSLER.

Ce fait du mûrissement des préparations à grains fins fait passer celle-ci par diverses structures réalisant des étapes plus ou moins longues dans le phénomène, pour aboutir toujours à un temps où l'on a un milieu constitué par des grains plus ou moins fins visibles au microscope (obj. à sec de 7 ou 3, ou à immersion) en suspension dans un liquide intergranulaire.

Les divers stades parcourus par toutes nos préparations ont été minutieusement étudiés, et pour chacune d'elles a été choisi un temps de dosage où la préparation est une suspension de grains fins dans un liquide intergranulaire, de composition chimique con-

nue, de constitution physique définie, sans action sur le grain lui-même et capable de réaliser par ses propriétés chimiques et physiques, en particulier par sa viscosité, une suspension stable et homogène.

Nous avons étudié la précipitation du chlorure d'argent, de l'urate cuivreux, du complexe acétone mercurique par le réactif de NESSLER, du phosphomolybdate de strychnine, du sulfate de benzidine et du sulfate de baryum, du digitonide de cholestérol, du calomel, de l'oxalate de chaux microcristallin, de la dixanthylurée, composés qui, par leur insolubilité en milieu convenable permettent le dosage des constituants immédiats des liquides biologiques, chlorures, acide urique, acétone, phosphates, cholestérine, sucres réducteurs, chaux, urée ; corps utiles à doser dans la biochimie et l'exploration clinique moderne.

Ces précipités réalisant pour la plupart un milieu colloïdal vrai à l'état initial, présentent vite l'état de suspension où ils sont maintenus stables en utilisant précisément les règles de la statique des suspensions.

Avant d'examiner quels sont les dimensions et l'état de ces grains tant à leur état initial qu'à l'instant de la mesure photométrique (ce qui importe surtout de connaître) où l'on a affaire à des suspensions, quels sont les moyens d'observation utilisés, de dénombrement, de séparation, de mesure du diamètre et de la densité des grains.

Les moyens d'observation, ce seront d'abord les ultramicroscopes pour les grains précipités, à l'état initial, ayant un diamètre plus petit que la longueur d'onde lumineuse, c'est-à-dire de moins de $0\mu 2$. Le principe de ces appareils, qui est celui du phénomène de TYNDALL, consiste à éclairer les particules par un rayon lumineux puissant et à les observer latéralement sur un milieu obscur, on a le phénomène réalisé par un faisceau lumineux pénétrant dans une chambre noire et illuminant une multitude de poussières, ou le cas des étoiles visibles la nuit.

Grâce au phénomène de la diffraction qui est d'autant plus intense que l'objet est plus opaque, les particules solides sont visibles.

Notons en passant, que à cause de la faible intensité de la lumière diffusée, la possibilité de voir les objets ultramicroscopiques est à son tour bornée par les limites de la puissance de la lumière artificielle. Actuellement, il est possible d'apercevoir des points

lumineux, images d'objets de dimensions minima de $4\ \mu$; pour des dimensions supérieures, on aperçoit des anneaux concentriques, puis des sphères lumineuses pour des particules de $0\ \mu\ 25$ à $1\ \mu$ qui, elles, sont déjà visibles au microscope. La mesure du diamètre du grain est impossible à l'ultramicroscope, car, la grandeur observée n'est pas du tout proportionnelle à la grandeur réelle des grains ultramicroscopiques; il paraît évident de même, pour qui a manipulé l'ultramicroscope, qu'il est difficile de faire une numération de grains à l'ultramicroscope, quoique certains appareils permettent un déplacement latéral régulier sans extinction, par exemple l'appareil de NACHET; au sujet des appareils, actuellement les dispositifs employés dans la technique ultramicroscopique sont le condensateur parabolique de ZEISS, ou le condensateur à miroir de REICHERT, destinés surtout à l'étude des microbes vivants ou des colloïdes à grosses particules. De plus les condensateurs cardioïdes de NACHET, concentriques de LEITZ, sont capables de produire un fond bien noir et par conséquent permettent l'observation et la photographie des colloïdes à micelles fines. De plus, ce qui est fort intéressant en pratique, un certain nombre d'appareils rend possible le passage immédiat de l'observation ultramicroscopique, à l'observation microscopique. Citons le condensateur alternatif de LEITZ, le condensateur universel de REICHERT. Enfin, l'ultracondensateur de LEITZ permet l'examen des colloïdes dans les gaz et dans les liquides à une température donnée.

La source lumineuse doit être intense ; notons que, quand on emploie la lumière électrique, surtout celle de l'arc, il est bon d'intercepter les rayons caloriques et autant que possible les ultraviolets qui ont parfois sur les préparations examinées une action néfaste étudiée par STINTZING (1).

La technique de l'ultramicroscopie comporte des détails très importants. D'abord, il faut des milieux liquides très purs (eau distillée) et des lames et lamelles très propres. Pour obtenir propres ces lames et lamelles, le mieux est de les frotter avec du papier de riz très fin, les épousseter au blaireau, puis les plonger alternativement dans du permanganate de potasse et de l'acide sulfurique, puis on les rince à l'eau et à l'eau distillée, puis à l'alcool et on les sèche à l'étuve. Tout ceci fait en tenant la lame ou lamelle dans

1. STINTZING, *Koll. Bioch.*, 1914, v. 6, p. 230.

des mors de fer. L'ultramicroscope permet de voir la structure des préparations, les grains très fins, le mouvement.

Il permet aussi de réaliser la cataphorèse des grains dans une préparation colloïdale donnée par une méthode simple que j'ai utilisée. Pour observer cette cataphorèse et en déduire la charge électrique des granules, nous plaçons entre la lame et la lamelle 2 fines feuilles de platine qui sont reliées chacune aux pôles d'une batterie de 4 volts (il faut employer de faibles chutes de potentiel qu'on essaie par tâtonnements, l'intensité du courant a peu d'influence); sous l'action du courant, on voit les granules se déplacer. Ce dispositif est également applicable à l'examen microscopique; pour le réussir, il faut des préparations et du matériel très propre, sinon il se produit des courants sans ordre dans la préparation; on peut réaliser également la cataphorèse et éviter l'électrolyse, comme l'ont montré COTTON et MOUTON, HARDY et MICHELLIS dans un tube en V ou la cloche de BECHOLD. On peut aussi photographier les images ultramicroscopiques; il est bon d'employer un objectif apochromatique, un oculaire à projection; comme source on emploie une lampe électrique forte ou une lampe à arc, on condense les rayons par deux lentilles; ces photographies sont délicates; il est bon, pour avoir de bonnes préparations, de laisser sécher un peu la préparation sur une lame bien propre pour lui donner une légère viscosité.

Si l'on voulait cinématographier les mouvements des particules, il faudrait employer un objectif apochromatique.

Notons que ces objectifs se distinguent au point de vue optique de tous les systèmes de lentilles employés auparavant par le microscope, par la réalisation simultanée de deux conditions relatives à la réunion des rayons lumineux en un même foyer, conditions qui n'avaient encore jamais été employées. La première consiste dans la convergence en un même point de l'axe de trois rayons de couleur différente, c'est-à-dire dans la suppression du spectre secondaire existant dans les anciens systèmes achromatiques. La seconde condition consiste dans la correction de l'aberration de sphéricité par deux rayons de couleur différente, tandis qu'auparavant cette correction n'était atteinte que pour un seul rayon. Grâce à ce dispositif les images sont plus parfaites, les couleurs naturelles des objets sont appréciables, l'image est aussi nette sur les bords qu'au milieu du champ.

Les images de différentes couleurs qui forment en se superposant l'image complète d'un objet, ont des dimensions différentes quand on se sert des objectifs apochromatiques et l'image bleue est plus grande que l'image rouge. Afin de pouvoir supprimer complètement ce défaut, les oculaires compensateurs sont calculés de manière à présenter au même degré le défaut contraire ; ils donnent pour les rayons rouges une image plus grande que pour les rayons bleus ; les oculaires compensateurs donnent une image pure de la préparation, sans contours colorés.

Parmi les précipités des principes immédiats des liquides biologiques, seul, le précipité de chlorure d'argent présente vraiment les caractères colloïdaux, il a le diamètre voulu des grains, il présente le mouvement brownien, la cataphorèse que nous avons trouvée négative par le précipité.

Encore cette préparation floccule-t-elle vite, comme nous l'avons montré. Il en est à plus forte raison des autres préparations à grains fins, urate cuivreux, combinaison acétone-mercurique, et c'est finalement des suspensions à grains fins qui sont en présence et ce sont elles que nous avons étudiées le plus.

Pour observer ces préparations, d'abord nous avons notre œil nu : en observant en effet, une suspension et en la mettant de côté pour l'observation à des intervalles de temps donnés, on peut se rendre compte de sa stabilité et de son homogénéité microscopique, qui sont évidemment les qualités premières d'une préparation devant servir à un dosage optique ; avant de poursuivre plus loin l'examen d'une telle préparation, ce premier examen du plus haut intérêt indiquera les premiers traitements à faire à la préparation ; modification de la viscosité du liquide intergranulaire, précipitation du grain en milieu plus ou moins dilué, détails techniques envisagés plus loin ; puis c'est le microscope qu'il faut employer. La technique de l'observation des émulsions et suspensions a été minutieusement établie par M. J. PERRIN (1) et ses élèves, nos préparations ont été examinées selon leurs directives, les grains qui les constituent sont de l'ordre de grandeur de ceux utilisés dans les émulsions de ces savants :

1. J. PERRIN, *Les Atomes*, 1 vol.

Conférence de M. J. PERRIN à la Société française de Physique : mouvement brownien et molécule. *Les Atomes* de J. PERRIN, *Ann. de Physique et Chimie*, sept. 1909.

« Ce n'est pas sur une hauteur de quelques centimètres ou même de quelques millimètres, écrit M. J. PERRIN, mais sur des hauteurs inférieures au dixième de millimètre que l'on peut étudier utilement les émulsions que j'ai employées. J'ai donc fait cette étude au microscope. Une gouttelette d'émulsion est déposée dans une cuve plate (par exemple une cellule de ZEISS, profonde de $1/10^e$ de millimètre pour numération de globules rouges plus aplatie pour un couvre objet dont les bords sont noyés dans la paraffine pour éviter l'évaporation.

On peut placer la préparation verticalement, le corps du microscope étant horizontal ; on peut avoir alors d'un seul coup une vue d'ensemble sur la répartition en hauteur de l'émulsion. J'ai fait ainsi quelques observations, mais jusqu'ici aucune mesure. On peut aussi, comme on le voit également sur la figure, placer la préparation horizontalement, le corps du microscope étant vertical.

L'objectif employé, de très fort grossissement, a une faible profondeur de champ et l'on voit nettement à un même instant les grains d'une tranche horizontale très mince dont l'épaisseur est de l'ordre du micron. Si l'on élève ou abaisse le microscope, on voit les grains d'une autre tranche.

De l'une ou de l'autre manière, on constate que la répartition des grains à peu près uniforme après l'agitation qui accompagne forcément la mise en place, cesse rapidement de l'être, que les couches inférieures deviennent plus riches en grains que les couches supérieures, mais que cet enrichissement se ralentit sans cesse et que l'aspect de l'émulsion finit par ne plus changer. Il se réalise donc bien un état de régime permanent dans lequel la concentration décroît avec la hauteur. On a une idée de cette décroissance par la figure ci-contre, obtenue en plaçant l'un au-dessus de l'autre les dessins qui reproduisent la distribution des grains en un instant donné, en cinq niveaux équidistants dans une certaine émulsion. »

Une série d'examenés pratiqués ainsi que l'indique M. J. PERRIN permet de juger de la structure de la suspension, des dimensions égales ou inégales des grains, de l'homogénéité et de la stabilité de la préparation.

Il est intéressant de faire des mesures, d'abord du nombre de grains, ce qui pour nos préparations permet de constater l'augmentation du nombre de grains avec les concentrations plus fortes, et de tracer des courbes du nombre de grains en fonction des concentrations ; cette méthode n'est pas nouvelle, elle a été employée

par ISSOGLIO (1) et critiquée par BOINOT dans sa thèse (2) ; malgré cette critique, elle donne cependant une idée assez nette des concentrations en grains, puisqu'elle a permis à M. J. PERRIN de retrouver le nombre d'AVOGADRO, suivant la technique que nous reproduisons plus loin (3). La connaissance de N et de d nous permettra aussi de calculer l'absorption en utilisant les formules de l'absorption de lord RAYLEIGH ou CHÉNEVEAU et AUDUBERT, suivant les cas envisagés.

Dans certains cas où il est compliqué et assez délicat de faire de la microphotographie des préparations, on peut les reproduire au crayon au moyen de la chambre claire ; ce procédé permet de reproduire la structure des suspensions où le grain a à peu près le même indice de réfraction que le liquide qui le suspend, il est donc peu facile de le photographier ou pour le faire il faudrait ajouter un liquide coloré au milieu intergranulaire, ce qui donnerait une observation en dehors des conditions de réaction et de mesures optiques. Les observations et les mesures qu'il est nécessaire d'effectuer sur les grains ne se bornent pas là. La connaissance de la densité de la matière qui forme les grains est utile à connaître, elle permet de prévoir la stabilité de la suspension et guide dans la préparation du liquide intergranulaire. On peut la déterminer de 3 façons, et nous empruntons le texte de M. J. PERRIN :

« J'ai déterminé cette densité de 3 façons différentes :

A. Par la méthode du flacon, comme pour une poudre insoluble ordinaire : on mesure les masses d'eau et d'émulsion qui emplissent un même flacon, puis par dessiccation à l'étuve, la masse de résine suspendue dans l'émulsion.

Cette dessiccation à 110° donne un liquide visqueux, qui ne perd plus de poids dans l'étuve et qui se solidifie à la température ordinaire en un verre transparent jaune.

B. En mesurant la densité de ce verre probablement identique à celui qui forme les grains. On y arrive le plus aisément en en mettant quelques fragments dans de l'eau à laquelle on ajoute progressivement assez de bromure de K pour que ces fragments restent suspendus, sans s'abaisser ni s'élever dans la solution, dont il suffit alors de mesurer la densité.

C. En ajoutant du bromure de potassium à l'émulsion même, jusqu'à

1. ISSOGLIO, *Chim. Abstracts* (II), CXVI.

2. BOINOT, thèse Nancy.

3. J. PERRIN, *Les Atomes*.

ce qu'une centrifugation énergique ne fasse ni monter ni descendre les grains et en mesurant la densité du liquide ainsi obtenu.

Les trois procédés concordent, donnant par exemple pour un même lot de grains de gomme-gutte respectivement les 3 nombres : 1, 1942, 1,194, 1, 195.

Volume des grains. — Ici, plus encore que pour la densité, en raison de l'extrême petitesse des grains, on ne peut avoir confiance dans les résultats que s'ils sont obtenus de plusieurs façons différentes. J'ai employé trois procédés :

A. Mesure directe du rayon à la chambre claire. La mesure sur les grains isolés comporterait de fortes erreurs (élargissement par diffraction des images de petits objets). Cette cause d'erreur est très diminuée si on peut mesurer la longueur d'onde d'une rangée de grains en nombre connu. Pour cela je laisse évaporer sur le porte-objet du microscope une gouttelette d'émulsion très diluée non recouverte de couvre-objet. Quand l'évaporation est presque terminée, on voit par suite d'actions capillaires, les grains courir et se rassembler par endroits, sur une seule épaisseur, en rangées assez régulières, comme des boulets sont rangés dans une tranche horizontale d'une pile de boulets. On peut alors, *ou bien compter combien il y a de grains dans une rangée de longueur mesurée, ou bien combien il y a de grains serrés les uns contre les autres dans une surface régulièrement couverte.*

B. *Pesée directe des grains.* — Au cours d'autres recherches, j'ai observé que, en milieu faiblement acide (1/100 normal) les grains se collent aux parois de verre sans s'agglutiner encore entre eux. A distances notables des parois, le mouvement brownien n'est pas modifié. Mais sitôt que les hasards de ce mouvement amènent un grain contre une paroi, ce grain s'immobilise et après quelques heures, tous les grains d'une préparation microscopique d'épaisseur connue (distance du porte-objet au couvre-objet) sont fixés. On peut alors compter à loisir tous ceux qui se trouvent sur les bases d'un cylindre droit arbitraire (base dont la surface est mesurée à la chambre claire). On répète cette numération pour diverses régions de la préparation. Quand on a ainsi compté plusieurs milliers de grains, on connaît la richesse en grains de la gouttelette prélevée, aussitôt après agitation, dans une émulsion donnée. Si cette émulsion est titrée, on a par une simple proportion la masse ou le volume d'un grain.

C. *Application de la loi de Stokes.* — Supposons que l'on abandonne à elle-même à température constante, une longue colonne verticale de l'émulsion uniforme étudiée. On sera tellement loin de la répartition d'équilibre que les grains des couches supérieures tomberont comme les gouttelettes d'un nuage sans qu'on ait pratiquement à se préoccuper

du reflux dû à l'accumulation des grains dans les couches inférieures. Le liquide se clarifie peu à peu dans sa partie supérieure. C'est ce que l'on constate aisément sur l'émulsion contenue dans un tube capillaire vertical situé dans un thermostat. Le niveau du nuage qui tombe n'est jamais très net, car en raison des hasards de leur agitation, les grains ne peuvent tomber tous de la même hauteur ; pourtant en pointant le « milieu » de la zone de passage on peut évaluer à 1/50 près la valeur moyenne de cette hauteur de chute (ordre de grandeur : quelques millimètres par jour) et par suite la vitesse moyenne de cette chute.

D'autre part : STOKES a établi (et l'expérience a vérifié pour des sphères de 1 mm. par ex.) que la force de frottement qui s'oppose dans un fluide de viscosité Z au mouvement d'une sphère de rayon d , de vitesse v , est $F = ZX d v$ — de là on peut calculer d . »

Les photographies microscopiques des grains se font facilement avec les objectifs à sec, nous avons construit nous-même notre appareil, les préparations ont été photographiées avec un objectif 7, et les plaques utilisées ont été des plaques Lumière « Micro » spéciales pour la microphotographie et donnant des images nettes et fouillées, et les plaques Lumière « Panero micro », permettant de saisir les différences en couleurs et donnant du relief. Les épreuves ont toutes été renforcées par tirage sur papier « spécial contraste ». La plupart des clichés insérés dans ce travail ont été obtenus par ce dispositif.

Reste à faire des mesures précises : « Nous avons déjà, écrit M. Jean PERRIN, le rayon d du grain et sa densité apparente ($D-d$) différence entre celle D du grain et celle d aisément connue de l'eau ou du liquide intergranulaire. La distance verticale H des deux tranches successivement mise au point s'obtiendra en multipliant le déplacement H' du microscope par l'indice de réfraction des milieux qui séparent le couvreb-objet. Mais il nous faut encore déterminer le rapport $\frac{n}{n'}$ des richesses en grains de l'émulsion à deux niveaux différents.

Ce rapport $\frac{n}{n'}$ est évidemment égal au rapport moyen des nombres de grains qu'on voit au microscope aux niveaux étudiés. Mais au premier abord, ce dénombrement semble difficile : il ne s'agit pas d'objets fins et quand on aperçoit quelques centaines de grains qui s'agitent en tous sens, disparaissent d'ailleurs sans cesse en même temps qu'il en apparaît de nouveaux, on n'arrive pas à évaluer leur nombre, même grossièrement.

Le plus simple est certainement, quand on le peut, de faire des photographies instantanées de la tranche étudiée, puis de relever à loisir sur des clichés le nombre des images nettes de grains.

Mais en raison du grossissement nécessaire et du faible temps de pose, il faut beaucoup de lumière, et pour les grains de diamètre inférieur au demi-micron je n'ai jamais pu avoir de bonnes images.

Dans ce cas, je réduisais le champ visuel en plaçant dans le plan focal de l'oculaire un diaphragme formé par une rondelle opaque de clinquants percé par une aiguille d'un très petit trou rond. Le champ alors perçu devient très restreint, et l'œil peut saisir d'un coup le nombre exact des grains qu'il voit à un instant donné. Il suffit pour cela que ce nombre reste inférieur à 5 ou 6. Plaçant alors un obturateur sur le trajet des rayons qui éclairent la préparation, on démasquera ces rayons à intervalles réguliers, notant successivement le nombre des grains aperçus qui seront par exemple :

3.2.0.3.2.2.5.3.1.2.

Recommençant à un autre niveau, on notera de même une suite de nombre tels que :

2.1.0.0.1.1.3.1.0.0.

En comprend, en raison de l'irrégularité du mouvement brownien que par exemple 200 lectures de ce genre remplacent une photographie instantanée qui embrasserait un champ 220 fois plus étendu.

Equilibre statique d'une colonne d'émulsion. — Il est dès lors facile de vérifier avec précision que la répartition des grains finit par atteindre un régime permanent. Il suffit de prendre d'heure en heure le rapport

$\frac{n}{n'}$ des concentrations en deux niveaux déterminés. Ce rapport voisin de 1, grandit et tend vers une limite. Pour une hauteur de 1/10 de millimètre, et quand le liquide interglanulaire était de l'eau, la répartition limite était pratiquement atteinte après une heure (j'ai en particulier trouvé rigoureusement les mêmes rapports après 3 heures et après 15 jours).

La *répartition limite* est une répartition d'équilibre réversible, car si on la dépasse, le système y revient de lui-même. Un moyen de la dépasser (de faire accumuler trop de grains dans les couches inférieures) est de refroidir l'émulsion, ce qui provoque un enrichissement des couches inférieures, puis de lui rendre sa température primitive : la distribution redevient alors ce qu'elle était (1). »

1. Ceci dû à l'agitation des molécules : « plus cette agitation sera faible, c'est-à-dire plus la température sera basse et plus l'affaissement de la co-

Nos examens ont été faits soit à l'immersion dans l'eau, soit le plus souvent avec objectif 7-8, 0 c. 2-3.

Il est possible de mesurer le *diamètre et le volume des grains*, cette connaissance de d permettant de calculer l'absorption, ainsi que nous le disions ci-dessus. Nous avons, en effet, cherché, connaissant n et d , à calculer l'absorption 1 pour un appareil donné, produite par des suspensions à diverses concentrations, en utilisant les lois de lord RAYLEIGH.

Pour séparer les grains d'une suspension, afin d'opérer sur leur masse une pesée, une prise directe de densité, ou encore pour les remettre en suspension dans un milieu approprié, on les soumet à la centrifugation, opération que l'on fera à grande vitesse pour une pesée, afin de coller le plus possible les grains, ou au contraire à vitesse moyenne quand ils devront être remis en suspension dans un liquide de composition connue et de propriété physique définie, condition de première importance pour les mesures optiques et dont il est tiré le plus possible profit dans les techniques qui seront préconisées ici. Un procédé de centrifugation découvert par M. J. PERRIN permet de constater si une suspension n'est pas de grains égaux et de même densité et de préparer les grains de même nature, c'est la centrifugation fractionnée.

« Une fois l'émulsion obtenue, écrit M. J. PERRIN (1), on la soumet à une centrifugation énergique (comme on fait pour séparer les globules rouges et le sérum du sang). Les sphérules se rassemblent en formant une boue épaisse au-dessus de laquelle est un liquide impur qu'on décante. On délaie cette boue dans de l'eau distillée, ce qui remet les grains en suspension et l'on recommence jusqu'à ce que le liquide intergranulaire soit de l'eau pratiquement pure.

Mais l'émulsion ainsi purifiée contient des grains de tailles très diverses et il faut préparer une émulsion uniforme (à grains égaux). Le procédé que j'ai employé peut se comparer à la distillation fractionnée. De même que pendant une distillation, les parties d'abord évaporées sont plus riches en constituants volatils, de même pendant la centrifugation d'une émulsion pure (grains de même nature) les couches d'abord sédimentées sont plus riches en gros grains et il y a là un moyen de sépa-

lonne sera marqué ». Voir la loi de répartition du nombre de grains et sa vérification expérimentale pour une température donnée (conforme à la loi de GAY-LUSSAC pour les gaz).

1. J. PERRIN, *Les Atomes*.

rer les grains selon leur taille. La technique est assez facile à imaginer pour qu'il n'y ait pas lieu d'insister. J'ai utilisé des vitesses de rotation de l'ordre de 2.500 tours par minute, ce qui donne à 15 cm. de l'axe une force centrifuge qui vaut 1.000 fois environ la pesanteur. Il est à peine utile d'observer que, comme pour tous les genres de fractionnement une bonne séparation est longue. J'ai utilisé dans mon fonctionnement le plus soigné 1 kg. de gomme-gutte, pour obtenir après quelques mois une fraction contenant quelques décigrammes de grains dont le diamètre était sensiblement égal à celui désiré ».

La préparation du liquide intergranulaire d'une suspension, la connaissance et la mesure des propriétés de ce liquide a le plus haut intérêt et doit être l'objet de soins particuliers.

Il doit présenter un certain nombre de caractères et propriétés définis :

1° Il doit être sans affinité chimique pour le précipité qu'il suspend.

2° Destiné à une mesure photométrique sur un appareil étalonné, il doit se retrouver à chaque mesure de composition chimique et de propriétés physiques constantes, le grain précipité étant la seule « variable » dans les diverses mesures de concentrations variables en éléments à doser.

3° Il doit être d'une densité égale ou supérieure au grain qu'il suspend. Nous avons mesuré les densités de nos liquides suspenseurs par la méthode du flacon, ou à l'aide du densimètre.

4° Il doit être d'une viscosité suffisante, la viscosité est une des notions les plus importantes dans la connaissance et la pratique des colloïdes ; elle est pratiquement le facteur le plus important de la stabilité des suspensions, elle caractérise ces préparations colloïdales dites suspensoides, dans lesquelles la viscosité de la préparation est égale à celle du milieu suspenseur et les différences des émulsoides, préparation à grosse viscosité, telle la gomme arabique.

La viscosité peut se définir : le frottement intérieur ou résistance rencontrés par les molécules ou lésions d'un électrolyte dans leur migration. POISEUILLE en a donné une formule mathématique pour les solutions. La représentation de la viscosité des colloïdes est plus complexe, elle est cependant une des caractéristiques des colloïdes. GRAHAM disait : « un viscosimètre est un colloïdoscope ».

Elle se modifie chez les colloïdes avec le temps, la température,

l'addition de gélatine (GARNETT) (1), le mode de préparation (LIVITES) (2). Nous nous sommes servi de ces remarques et nos mesures ont été faites par le viscosimètre de VLÈS et de BAUME, et le viscosimètre de CUVIER pour les mesures approximatives.

Pour augmenter la stabilité de nos suspensions, nous avons augmenté leur viscosité par la glycérine, les solutions sucrées.

Voici un tableau de leur viscosité :

Substances	Viscosité absolue n° à 15 c
Eau.....	— 0,01124
Glycérine	— 10,69
Sucre à 40 %.....	— 0,0798

5° La tension superficielle.

Elle a son importance, elle représente la cohésion moléculaire, ou l'élasticité entre les molécules suivant la comparaison de SEGNER (3) reprise par YOUNG.

Au point de vue de la statique des colloïdes, elle a une grosse importance, elle est la seule force, au fond, qui tende à diminuer la surface énorme des micelles colloïdales, elle est compensée par la répulsion électrostatique due à la charge uniforme des micelles, ainsi que l'ont montré PAULÉ (4) et HOFNIFISTER.

6° Les électrolytes en présence sont des facteurs de stabilisation, ou de floculation, mis en évidence par ZIGMONDY dès nos premières connaissances sur les colloïdes.

La présence des électrolytes a une grosse influence sur la stabilité des solutions suspensoïdes ; cette influence existe aussi sur les suspensions, ainsi que l'ont montré STINGL, MORAWSKI et BODLENDER, SPRING, MICHAELIS, ROMA, BETHOLD ; ces travaux présentent des exemples de sédimentation de suspension par les électrolytes.

7° La charge en ions (H) + a son influence aussi bien sur les solutions colloïdales que sur les solutions suspensoïdes, les suspensions, les émulsions, ceci démontré par PAULI, MICHAELIS et surtout LÆB.

8° Enfin, on conçoit que le degré de dispersion ait quelque influence et que dans un milieu de viscosité, de densité, de tension

1. *Loc. cit.*

2. LIVITES, *Kell. Zeit.*, 1907, v. 2, p. 240.

3. SEGNER, 1752. Cf. SEGNER in CHWOLSON, *Traité de Physique*. Paris, 1907, v. 1, p. 594.

4. *Kolloidstudien um Eiweiss*. Dresden.

superficielle données, le mûrissement et la sédimentation soient plus ou moins longs, suivant le degré de dispersion.

Connaissant les constituants des suspensions, en possession de la technique d'observation et de mesures de ces constituants et de leurs diverses propriétés utilisées pour le but proposé, *quels sont les caractères et les méthodes de la stabilisation et de la sédimentation des suspensions*, de la dispersion et de la floculation de ces mêmes préparations.

Si nous considérons une suspension à grains fins ou une solution suspensoïde, on peut dire que sous l'influence de certains facteurs, les suspensions sédimenteuses et les sols suspensoïdes flocculent. *Quels sont ces facteurs ?*

A. — Sédimentation et suspension se réalisent par une multitude de changements et d'états physiques.

Si on considère par exemple une suspension de chlorure d'argent ou de sulfate de baryum, on peut voir au microscope les grains grossir ; à l'œil nu on voit la préparation flocculer. Si l'on observe un sel d'or préparé selon ZIGMONDY, on peut le voir changer de couleur. A ce sujet important pour nous, OSTWALD écrit :

« La floculation nécessite un certain temps comme tous les changements d'état des colloïdes. De plus, la vitesse de floculation varie considérablement avec les conditions expérimentales. La floculation ne peut donc pas être définie par des constantes (point, concentration, temps, température, etc., de floculation) pas plus d'ailleurs que la gélification.

Il existe cependant un procédé irréprochable au point de vue théorique pour la mesure de la floculation qui consiste à déterminer des courbes de la vitesse de variation de la grosseur et de l'imprégnation des grains pendant la coagulation. Une méthode directe de cette nature et particulièrement exacte est la numération ultramicroscopique des grains contenus dans un volume donné de la solution pendant la floculation. Naturellement cette méthode n'est applicable que dans le cas de sol complètement résoluble à l'ultra microscope.

Tandis que cette méthode n'est applicable que dans des cas assez rares, il y en a d'autres, directes également, qui ont une utilisation beaucoup plus générale.

Un procédé très simple consiste à déterminer la floculation au point de vue cinétique, en suivant la sédimentation d'un système flocculant. Si l'on remplit les 2 branches d'un tube en U avec 2 liquides de densités différentes, les hauteurs des colonnes liquides seront entre elles

comme l'inverse de leur densité. Si la densité de l'un des liquides varie, la différence de niveau varie également jusqu'à ce que ces 2 liquides aient le même poids spécifique. Une variation analogue de la densité se présente lorsque la partie supérieure d'un système en voie de sédimentation s'appauvrit en granules. Un appareil utilisé d'abord par C. Wiegner pour la mesure des phénomènes de la sédimentation et basé sur ce principe est représenté par la figure 21 (1), on l'appelle « flocculomètre à deux branches ». Il est constitué essentiellement d'un grand tube en U de 130 cmc. et de forme indiquée par la figure.

Le tube étroit appelé aussi « tube de comparaison » (d'environ 3 mm.7 de diamètre), est muni d'un robinet à sa partie supérieure, et à sa partie inférieure d'une boule dont l'extrémité étranglée et soudée au tube de sédimentation. On restreint, grâce à cet artifice, le mélange du liquide de comparaison avec le sol qu'on étudie. Le tube à sol porte à sa partie inférieure une ampoule (de 8 cm. de longueur et de 8 à 10 mm. de diamètre) munie d'une vidange fermée avec un bouchon rodé. L'extrémité supérieure du tube à sol est évasée, ce qui permet le remplissage sans bulles d'air. On fait la lecture sur une glace divisée qui commence à 1 m. au-dessus de la communication des 2 tubes et finit à 1 m. 30 environ.

Le mode d'opération est le suivant : On remplit tout d'abord l'appareil du liquide de comparaison (eau distillée par ex.) jusqu'à la division 120.

On ferme ensuite le robinet du tube de comparaison et on ouvre la vidange du tube de sédimentation. On vide de cette manière le tube à sol, tandis que le tube à comparaison reste intact grâce à l'étranglement et à la fermeture de la partie supérieure. On rince ensuite le tube de sédimentation avec le sol que l'on se propose d'étudier et on le remplit jusqu'à la division 115. On ouvre le robinet et on observe le déplacement du ménisque. On note la différence de niveau dans des intervalles de temps déterminés par la vitesse de coagulation et la précision que l'on désire obtenir.

Le flocculomètre à un tube est encore plus sensible (également pour les variations de température). Un exemple d'une mesure flocculométrique faite sur un sol de sulfure de mercure au moyen de l'appareil décrit plus haut est résumé dans le tableau suivant :

1. Cf OSTWALD, *loc. cit.*

Temps en minutes après addition du coagulant	Hauteur dans le tube à sol	Hauteur dans le tube de comparaison	Différence
2	1.272,4	1.312,2	39,8
4	1.272,4	1.312,2	39,8
6	1.272,4	1.312,2	39,8
7	1.272,4	1.312,2	39,8
8	1.272,4	1.312,2	39,8
9	1.273,2	1.310,4	37,2
10	1.273,6	1.309,6	36,0
12	1.274,1	1.308,7	34,6
15	1.275,1	1.306,9	31,8
18	1.275,7	1.305,8	30,1
22	1.276,8	1.303,8	27,0
26	1.277,4	1.302,6	25,2
30	1.277,9	1.302,5	24,6

Les mesures directes de détermination de la vitesse de floculation basées sur un changement temporaire d'une propriété physico chimique quelconque sont plus générales et plus simples, exemple : le trouble, la tension superficielle la viscosité. »

B. — L'état physique antérieur du corps en suspension influence la sédimentation. Le kaolin congelé sédimente très vite d'après PIKERING (1).

C. — La vitesse d'addition du réactif floculant a une grosse importance. Ainsi FREUNDLICH a démontré que 2 cm³ d'une solution de BaCl² 9,5 millimolécules par litre déposent totalement en 7 heures 20 cm³ d'hydrosol de sulfate d'arsenic à 5,75 millinol par litre. Mais la même quantité d'électrolyte ajoutée goutte à goutte en 10 jours ne produit aucun effet floculant visible.

D. — L'ordre d'addition des éléments floculants a son importance.

E. — L'addition ou la suppression de certains sels ou de certains ions, ainsi que l'ont montré LINDER et PICTON (2).

F. — La diminution de la viscosité fait floculer à coup sûr les suspensions (3).

G. — De même l'augmentation de la tension superficielle.

1. PIKERING, *Kolloidzeitseht*, 1920, v. 7, p. 6.

2. LINDER et PICTON, *Frans. Chem. Soc.* London, 1905.

3. Cf. BOUTARIC, *C. R. A. S.*, février 1928.

H. — La stabilité des suspensions est aussi dominée par l'action des agents stabilisants ; en général ce sont les corps qui augmentent la viscosité et diminuent la tension superficielle, tels la glycérine, gomme, gélose, gélatine ; mais il y a autre chose dans cette action de protection (1) de tels corps vis-à-vis des colloïdes vrais, des suspensions, des émulsions. Il y a un effet de protection particulier, dit OSTWALD : « De petites quantités d'émulsoïdes imprégnés confèrent au suspensoïde, comme l'avait déjà montré Faraday, une stabilité notamment supérieure vis-à-vis des électrolytes. On a déjà parlé de l'action des colloïdes protecteurs dans la préparation des solutions colloïdales. On ne peut attribuer l'action protectrice des colloïdes imprégnés à une augmentation de viscosité, car dans beaucoup de cas des quantités extrêmement faibles sont déjà efficaces. Par contre, un certain nombre de faits semblent indiquer fréquemment une union entre les granules émulsoïdes et les granules suspensoïdes. Les conditions de stabilité de ces complexes sont dominées par celles du colloïde protecteur. On n'a encore pu établir si le granule émulsoïde, riche en liquide, forme une sorte d'enveloppe autour du granule suspensoïde, ou s'il capte les électrolytes et soustrait ainsi le grain protégé à leur action coagulante. Parmi ces colloïdes protecteurs, il y a la gélatine, l'ichtycolle, l'albumine, la caséine, l'hémoglobine, la gomme adragante, en outre les produits de dédoublement de l'albumine par les acides et les alcalis, comme la lysine, la proline, le tannin, etc. Parmi les colloïdes inorganiques, en particulier l'acide stannique fraîchement préparé (2).

Cette étude de la stabilité des suspensions nous a amené à faire nos préparations suivant deux principes de technique.

1^o Directement dans le liquide biologique où est l'élément à doser et le doser par absorption, tel qu'il se présente.

2^o Séparer le corps à doser de son milieu d'origine, puis le redisperser, après l'avoir insolubilisé, suivant les méthodes classiques dans un milieu physiquement et chimiquement défini. Cette dernière technique est préférable *a priori*, mais comment le problème se présente-t-il pratiquement ?

1. Cf. OSTWALD et voir une note de V. HENRI et MAYER, *C. R. S. Biologie*, 1906.

2. Pour des détails sur les colloïdes protecteurs inorganiques, voir A. GUTBIER et ses élèves dans *Koll. Zeit.*, 1916, 1922.

La considération des éléments grains, et liquides intergranulaires, des caractères définis que doivent présenter ces éléments, et des facteurs de la stabilisation et de l'homogénéité des suspensions pour les dosages optiques impose de rechercher un milieu de composition connue, de propriétés physiques définies. Or, nous voulons opérer des précipitations électives régies par les techniques de manipulation des suspensions exposées plus haut, dans les milieux biologiques (sang, etc.) ; ces milieux, répondent-ils aux conditions optima de précipitation de suspensions de grains et de dosages photométriques et spectrophotométriques ? Envisageons d'abord la question des éléments à doser et des grains précipités au moyen d'un réactif donné, et en général la composition chimique du milieu.

- Nous savons que la vitesse de formation du corps insoluble, donc le nombre de grains insolubilisés, la vitesse de coagulation et de sédimentation dépendent des corps en présence au moment de la réaction. Le volume du grain, ou si l'on veut son diamètre à un instant donné, dépend donc aussi de la composition du milieu. Or, les milieux biologiques sont de composition très variable d'un individu à l'autre, et chez ce même individu ; cela met en évidence *les principes qui régiront les précipitations des constituants des liquides biologiques, urines, sérum, plasma, liquide céphalo-rachidien, liquide d'épanchement* (liquide de plèvre, ascite, etc...) :

A. — La précipitation faite dans le milieu biologique serait susceptible de troubles et de variantes du fait de la composition du milieu, suivant les circonstances, les heures du jour, les états de santé ; tels varient la composition du sang, des urines après les repas (graisses, lécithine, acide urique, urée), et les rapports des éléments entre eux. Au point de vue qualitatif, les éléments du sang en particulier, les matières protéiques, ont une grosse influence sur la vitesse de grossissement des précipités microcristallins.

B. — Les propriétés physiques des liquides biologiques susceptibles de modifier la stabilité de la suspension ou la vitesse de formation sont également sujets à variation suivant les sujets considérés et leurs états de santé. En effet, reprenons les facteurs cités plus haut :

1^o La densité du sang qui est plus forte après les repas, est diminuée dans les anémies, les cachexies, elle augmente dans l'asystolie

les diarrhées abondantes, le choléra. La densité des urines est aussi essentiellement variable, en relation avec certains états pathologiques (diabète).

2^o La viscosité du sang est sujette à des variations journalières assez accentuées, elle accuse un minimum pendant la digestion ; le travail, l'alcool l'augmentent (1); SCHEITLIN (2) montre qu'elle est forte dans les maladies du poumon, faible dans l'anémie.

D'autres variations sont signalées dans les travaux de MULLER, BURTON, OPITZ, FERRAI, KOTTMANN, HAMBURGER.

3^o Il en est de même de la tension superficielle du sang ; elle est de 6,7 à 8,1 ; de nombreuses substances l'influencent, médicaments (iodures), alcool, chloroforme (dans la narcose) ; de même elle est modifiée dans certaines maladies, emphysème, asthme, hypertension, intoxications. Pour la tension superficielle de l'urine, mêmes remarques : les variations ont été étudiées par : CHAUFFARD, FRENKEL, CLOZET, AMANN, BELLARD, PERRIN, DONNAN, GRUEMBAUM, DUHOT, DOUMER. Citons la conclusion de MM. DUHOT et GERNEZ (C. R. S. Biol).

« La stalagnométrie urinaire a pris, depuis quelques années, une place importante dans l'étude des choluries salines : d'après les travaux récents, les variations de la tension superficielle des urines semblent susceptibles de fournir de précieuses indications sur la qualité de sels biliaires éliminés et même d'en permettre une sorte de dosage.

Or, les premiers auteurs qui, dès 1901, étudièrent la question (MEILLIÈRE, CLUZET et GRENKEL, AMAN, BILLARD et DIEULAFÉ en France, DOMAN en Angleterre) conseillaient par contre de ne pas accorder à la stalagnométrie une valeur absolue comme élément de mesure de l'élimination des sels biliaires, et insistaient sur les variations physiologiques de la tension superficielle des urines.

Devant ces avis, quelque peu contradictoires, nous avons étudié la tension superficielle des urines des sujets normaux, et étudié dans quelle limite elle varie.

1^o Les urines de 24 heures étudiées chez des sujets soumis au même régime alimentaire, donnent des résultats très dissemblables. Par exemple, nous avons obtenu, dans une expérimentation, les chiffres suivants :

1 DETERMANN, *Viskosität d. mensch. Bluter*. Weisbaden.

2. SCHEITLIN, thèse Zurich, 1909.

	Vol. des 24 cm ³	Densité	N. de gouttes	Tension super.
1 ^{er} sujet	2.125	1.014	113	897
2 ^e sujet	1.175	1.015	115	883
3 ^e sujet	1.050	1.027	131	783,6

2^o L'urine des 24 heures chez le même sujet, donne elle aussi des valeurs assez différentes pour la tension superficielle, selon que la concentration urinaire est plus ou moins élevée, que les boissons ont été plus ou moins abondantes, que la température a été plus ou moins forte.

Exemple chez un même homme :

	Vol. des 24 h. cm ³	D	N	Tension
Urine n° 1....	1.990	1.014	112	905,3
Urine n° 2....	1.250	1.018	117,5	866,3

3^o Si nous étudions la tension superficielle aux différentes heures de la journée :

	Vol. cm ³	D.	N.	Tension superf.
Urines de 23 h. à 7 h.....	450	1.022	123	830,8
Urines de 7 h. à 12 h. 30....	690	1.010	107,7	938
Urines de 12 h. 3 à 15 h. 45....	370	1.010	113	893,7
Urines de 15 h. 45 à 18 h.....	380	1.006	106,3	946,1
Urines de 18 h. à 21 h. 30....	100	1.020	115,4	883,3

La tension superficielle des urines est *susceptible chez l'homme normal de varier dans de telles limites qu'on ne saurait tenir compte d'un seul examen* d'urine quand les résultats sont supérieurs à 950. Par contre, la stalagnométrie reste une méthode intéressante pour l'étude de l'élimination des sels biliaires et de certaines substances, à condition de n'opérer que sur le même sujet et dans des conditions physiologiques identiques. »

CONCLUSION.

Ces faits font conclure :

1^o Qu'une précipitation faite directement dans le plasma ou le sérum est entachée d'erreur et qu'il faut éliminer de ces milieux par défécation avant la précipitation, tout élément variable, ou ce qui est mieux, extraire par une méthode chimique ou physique le corps à doser.

2° Qu'une précipitation faite dans un milieu biologique présente des causes d'erreur qui diminuent le résultat qu'elle peut donner, même en prenant toutes les précautions analytiques courantes.

3° Qu'il faut s'efforcer de précipiter le corps à doser dans un milieu nettement défini avant le dosage photométrique et le doser dans ce milieu défini.

Si la précipitation a lieu dans un milieu non défini, il faudra séparer le flocculum par centrifugation et le suspendre dans le milieu déterminé pour le dosage optique.

Essayant de pratiquer les dosages opacimétriques dans les milieux biologiques en utilisant les données sur l'optique des milieux troubles, et les principes de précipitation à grains fins, voyons quelles sont les méthodes pratiques, susceptibles de donner des résultats équivalents ou comparables à ceux des méthodes volumétriques ou pondérables ?

Chapitre IV

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LES TECHNIQUES DE PRÉ- CIPITATION A GRAINS FINS

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE POUR LES DOSAGES ET MICRODOSAGES OPTIQUES DES PRIN- CIPES IMMÉDIATS UTILES A DOSER DES LIQUIDES BIOLOGIQUES

L'application des principes et des méthodes de travail qui viennent d'être exposées aux dosages opacimétriques par spectrophotométrie et photométrie des constituants des humeurs de l'organisme présente d'abord un intérêt scientifique dans la recherche de l'influence des composants des humeurs sur la vitesse de formation et l'état physique du précipité, dans la recherche de méthodes physiques ou chimiques de séparation des éléments à doser. Elle en présente surtout dans l'application même des méthodes spectrophotométriques de mesure dans un milieu où la physique et la physique optique pénètrent de plus en plus ; citons les travaux de physique biologique d'un intérêt pratique de VERNES (1), DOURIS (2), de BLOCH et MESTREZAT (3), de SACCHI et GEORGI (4), de MECKLENBURG (5), de Victor HENRY (6), de MOLISH (7), de

1. VERNES, *C. R. A. S.*, 1917 à 1921 et fascicules (chez Maloine).
2. DOURIS, *C. R. A. S.*, 1917-1918 et *Bull. des Sc. Pharmacol.*, 1918.
3. BLOCH et MESTREZAT, *Soc. de Biologie*.
4. SACCHI et GEORGÉ, *Med. Klinik*, t. 33, 1918.
5. MECKLENBURG, *Kolloid Zeit.*, 1914-1915.
6. HENRY, *Soc. de Biol., J. de Chimie phys.*
7. MOLISH, *Bot. Zeit.*, 1908.

PEYRE (1), de M. R. FABRE (2), de VAUCHER (3), de STRUENBERG (4). Ces méthodes ont aussi un intérêt pratique ; des techniques de dosage rapide et d'une approximation satisfaisante étant les plus utiles en analyse biologique et dans l'exploration clinique ; on conçoit en particulier qu'une technique pour mesurer exactement et en série les chlorures, l'urée, les sucres dans les établissements hospitaliers ou les maisons d'exploration, les établissements thermaux présente un avantage sérieux. Dans ce but, les Américains ont dressé des méthodes de dosages néphélométriques de l'acétone, des chlorures, des sulfates, où la technique de précipitation et l'appareillage employés tiennent peu de compte des desiderata d'une telle méthode ; enfin, opérant plus souvent par diffusion que par absorption, ils commettent des erreurs nettement mises en évidence dans les chapitres précédents.

Dans les travaux exposés ici, il a été minutieusement pris en considération les divers facteurs (grains du précipité, milieu intergranulaire, appareils employés), susceptibles de réaliser des dosages ou microdosages, d'une technique scientifique et précise. Les éléments dont le dosage a été étudié sont ceux dont la mesure est utile et de pratique courante, aussi bien dans les recherches biochimiques que dans l'exploration clinique. Ce sont les chlorures, acétone, acide urique, sucres réducteurs, phosphates, cholestérine, urée, calcium.

Il convient de considérer l'état des précipités étudiés ; la plupart seront faits de grains amorphes. D'autres faits de grains microcristallins dont les dimensions varient légèrement avec la concentration et dont les techniques de manipulation sont différentes de celles des précipités amorphes, deux classes s'imposent de ce fait dans notre étude :

1^o *Corps précipités à l'état amorphe.*

2^o *Corps précipités à l'état microcristallin.*

De plus, pour chacune de mes études des corps étudiés, il sera exposé brièvement l'indication, les conditions ordinaires de son analyse, il sera bien défini ce qu'on précipite (ainsi dans le dosage de

1. PEYRE, *Soc. Biol.*, 1921.

2. R. FABRE, *Bibliographie Soc. de Biol.; Soc. Méd. des Hôp.; J. de la Pharm. française.*

3. VAUCHER, thèse Paris, 1911.

4. STRUENBERG, *Bibliographie.*

l'acide urique, nous précipiterons l'acide urique salifié, non les combinaisons uriques organiques), ce qui a été fait antérieurement à nous dans la néphélémétrie des corps envisagés, nos recherches, notre technique.

Ce travail a été commencé en utilisant le photomètre de VERNES, BRICQ, YVON (construit par la maison JOBIN), puis nous avons utilisé comparativement le spectrophotomètre de FERY et l'appareil de BAUDOUIN et BÉNARD. Le photomètre de VERNES, BRICQ spécialement construit pour les mesures par absorption sur de petites quantités de liquides, et particulièrement de liquides biologiques a été notre appareil de base ; les résultats qu'il nous a donnés seront, le cas échéant, comparés à ceux donnés par les deux autres appareils employés, et l'avantage de ceux-ci pour le microdosage, ou le microdosage, préconisé suivant les cas. Quant aux mesures d'éta-lonnage réalisées sur des suspensions obtenues par notre technique, elles seront faites et exposées en détail avec ces trois appareils.

ÉLÉMENTS DES LIQUIDES BIOLOGIQUES PRÉCIPITÉS A L'ÉTAT DE COMBINAISONS AMORPHES

**Chlorures, acide urique, phosphates, acétone,
sucres réducteurs, cholestérol.**

PREMIER DOSAGE

DOSAGE DES CHLORURES

NOTIONS BIOLOGIQUES. — Les chlorures (chlorures alcalins) existent dans toutes les humeurs de l'organisme. Leur rôle dans la nutrition paraît faible en dehors de la part qu'ils prennent à l'élaboration du suc gastrique ; leur importance physique est de premier ordre, ils maintiennent dans les humeurs le degré de concentration, ou mieux la tension osmotique nécessaire aux échanges nutritifs et à la vie. Le sérum sanguin en renferme environ 6 grammes par litre ; dans l'urine, chez l'homme sain, la quantité de chlorure éliminée en 24 heures est en moyenne de 12 à 14 grammes. Dans certains états pathologiques, il y a rétention des chlorures dans les tissus, le sérum, la lymphe, par suite d'imperméabilité rénale pour ces éléments. Au début ou à la période d'état d'un grand nombre de maladies aiguës, pneumonie, pleurésie avec épanchements, congestion pulmonaire, érysipèle, fièvre typhoïde, il y a diminution des chlorures urinaux. A la convalescence, il y a une décharge chlorurée qui est un bon pronostic.

Dans les œdèmes brightiques, il y a aussi rétention chlorurée dans les tissus, ce qui provoque une hydratation intense et œdème.

La décharge d'urine chez les malades atteints d'œdème est aussi d'un bon pronostic.

Le liquide céphalo-rachidien contient 7,25 à 7 gr. 40 de chlorure en NaCl par litre, les chlorures diminuent dans les méningites aiguës, augmentent dans l'urémie et l'imperméabilité rénale. Le liquide de plèvre, d'ascite, d'hydrocèle en contiennent le taux du sérum ; le liquide de kyste hydatique en contient plus.

Avant d'étudier le dosage photométrique des chlorures dans les divers liquides, il convient d'exposer nos recherches techniques sur la précipitation des chlorures d'une solution de NaCl dans l'eau distillée, d'adapter cette précipitation type aux appareils employés et de construire des courbes d'étalonnage de ces appareils avec le précipité envisagé.

A. — Précipitation des chlorures d'une solution titrée de chlorures de sodium. — Mesures photométriques. — Courbes d'absorption des précipitations colloïdales.

PRINCIPE. — La méthode est basée sur la réaction classique de la précipitation des chlorures par le nitrate d'argent.

Le chlorure d'argent donne dans certaines conditions une opalescence dont on mesure la « densité optique ».

HISTORIQUE. — Le dosage des chlorures par néphélémétrie est le premier dosage de ce genre qui ait été tenté. C'est celui qui a été le plus préconisé et souvent paraît une nouvelle méthode simple de précipitation et de dosage, alors que c'est le plus délicat, en se plaçant au simple point de vue rythme de précipitation : le grain varie, sédimente vite. Quelques travaux méthodiques sont à signaler ; AGLOT (1), GAY-LUSSAC, MILDER et STASS (2) se sont, au ^{xix}^e siècle, préoccupés de la néphélémétrie des chlorures, d'une façon plutôt empirique ; HURION (3), l'a étudiée, mais il faut arriver aux travaux des D^{rs} CLARK-WELLS (4), T. W. RICHARDS (5), A. LAMB, CARLTON et W. MELDRUN (6) pour avoir des renseignements précis ; nous y précisons des remarques utiles.

1. *Loc. cit.*

2. Bibliogr. citée *Am. Chem. Journ.*, t. XXXI, p. 235.

3. HURION, *C. R. A. S.*, 1891, t. CLXI, p. 5, 11, 31.

4. D^r CLARK-WELLS, *Am. Ch. Journ.*, t. 35, p. 29.

5. RICHARDS, *Am. Ch. Journ.*, t. 33, p. 511.

6. *Am. Ch. Journ.*, t. 33, 34, 35.

ETUDE DU RYTHME DE FLOCCULATION DU CHLORURE DE SODIUM EN SOLUTION AQUEUSE.

1^o Réactifs nécessaires :

Sol. de No^3H (de densité égale à 1,38) à 5 pour 100.

Sol. normale de No^3Ag .

Solutions de NaCl de 0 gr. 10 à 1 gr. 50 par litre.

Eau distillée.

Glycérine à 30^o B^e.

Nous utilisons le photomètre VERNES, BRICQ, YVON. Notre but est l'obtention rapide d'une opalescence stable, appréciable à l'échelle V. B. Y., constituée par des grains fins et de dimensions constantes.

Cherchant une précipitation totale des chlorures, en même temps que rapide, nous avons utilisé un flocculant du chlorure d'argent, No^3H dilué, qui règle l'état physique de la préparation à un instant donné. Quand on met en contact de l'azotate d'argent $\frac{\text{N}}{10}$, de l'acide azotique à 5 % et 10 % et des solutions de NaCl depuis 0 gr. 10 par litre à 2 gr., on peut constater que l'acide azotique en quantité notable fait flocculer et sédimenter vite et que les suspensions les plus stables sont les plus diluées, faits bien connus ; une série de recherches nous a permis de fixer pour la réaction les proportions suivantes à mesurer dans un petit tube à hémolyse ou directement dans une petite cuve du photomètre :

Solution de NaCl à x pour 1000.....	1/10 de cm^3
x étant inférieur à 1 gr. 50.	
(No^3H à 5 % No^3H d = 1,38)	1 cm^3
Agiter doucement 1 minute et ajouter	
No^3Ag N/10	1/10 de cm
Agiter doucement.	

VITESSE DE PRÉCIPITATION.

Dans ces conditions, on observe pendant un certain temps (quelques secondes) un accroissement rapide de l'opalescence, puis une période d'arrêt pendant laquelle la densité optique reste constante,

enfin, au bout d'un temps variable selon les concentrations, une précipitation.

Le problème revenait à trouver des conditions de concentration telles que la période de stabilité correspondrait à une densité optique comprise dans les limites de l'appareil et dont la durée serait la plus grande possible.

D'où la nécessité pour nous d'étudier l'influence de la concentration sur la vitesse de précipitation.

Retenons trois de nos recherches correspondant à des concentrations différentes en NaCl.

1^o *Concentration en NaCl de 0. gr. 50 par 1000.* — Le maximum d'opalescence est atteint en moins de 30 secondes et persiste pendant 5 à 6 minutes. La décroissance est très lente et s'effectue pendant un temps relativement très long (d'après WELLS, de l'ordre de 60 à 120 minutes).

2^o *Concentration de 1 gr. 10.* — Le maximum d'opalescence est atteint en une minute et demie. Il persiste pendant trois minutes 1/2 à quatre minutes. La décroissance est encore lente.

3^o *Concentration supérieure à 1 gr. 20 : par exemple 1,50 pour 1.000.* — La mesure de la densité optique devient très difficile, parce qu'on ne peut plus observer de période de stabilité. La précipitation, dans ce cas, est très rapide et totale en quelques minutes.

Nous avons été naturellement amenés à une interprétation graphique de ces résultats, ainsi qu'à l'examen microscopique et micrométrique du flocculum et du précipité.

INTERPRÉTATION GRAPHIQUE.

Les temps exprimés en minutes sont portés en abscisses, et en ordonnées, la densité optique vraie, c'est-à-dire la densité *observée*, diminuée de la *densité optique du milieu de suspension* :

Eau bi-distillée.....	2/10 de cm ³
NO ³ H à 5 pour cent	1 cm ³

Graphiquement, les résultats ci-dessus indiqués correspondent à trois portions de courbes différentes. La courbe monte, puis un plateau, la courbe descend.

Dans le 3^e cas envisagé, concentration de 1 gr. 50, le plateau est

réduit à un point. La courbe monte, passe par un maximum, d'ailleurs très difficile à saisir expérimentalement, puis décroît rapidement.

De ces différentes observations, nous tirerons la conclusion technique suivante : *Opérer à des concentrations inférieures à 1 gr. 20 et effectuer la lecture de la première à la troisième minute qui suivent l'addition des réactifs et leur agitation.*

Remarquons que WELLS a indiqué que la lecture devrait être faite dans les 5 minutes qui suivent.

Dans le cas de liquides biologiques, la vitesse de précipitation pour une concentration donnée est plus faible.

En étudiant les trois phases de la réaction, on constate :

1^o Une ascension plus lente dont le maximum n'est atteint qu'au bout de trois minutes seulement.

2^o Un plateau correspondant au maximum, plus régulier par suite d'une meilleure suspension des grains du floculum.

3^o Une période de précipitation apparaissant seulement entre la 5^e et la 7^e minute et durant plus longtemps que dans le cas de l'eau.

Il en résulte de ce phénomène que la lecture photométrique est plus facile dans les liquides biologiques ; elle se fera dans la phase du plateau, c'est-à-dire entre la 4^e et la 5^e minute, pour avoir la densité optique maxima.

L'interprétation graphique de cette vitesse de précipitation en milieu biologique, montre la régularité du phénomène et permet la comparaison avec les courbes de vitesse précédemment étudiées.

EXAMEN MICROSCOPIQUE ET MICROMÉTRIQUE

Des examens microscopiques et ultra-microscopiques des grains ont été faits. Ayant opéré sur des solutions dont la concentration en NaCl variait de 0 gr. 01 à 1 gr. 50 pour 1.000-cm³ d'eau bi-distillée, nous avons pu vérifier que la grosseur des grains n'est pas proportionnelle à la concentration et à la durée de la réaction pour toutes les concentrations envisagées.

Nous avons essayé de suppléer à cette évaluation approximative par des mesures micrométriques, mais, la période d'ascension de la courbe correspond pour le grain à une période d'accroissement

de ses dimensions sans cesse variables ; dans la période du plateau, les dimensions sont sensiblement constantes, mais elle est si brève que, matériellement, la mesure devient très difficile ; enfin, la période de décroissance correspond à une agglutination des grains (qui peuvent même devenir visibles à l'œil nu), agglomérats qui constituent le précipité.

Mais, cependant, nous avons pu évaluer que pour la concentration optimum 0 gr. 50, les dimensions des grains du floculum sont de l'ordre de grandeur de celles du floculum obtenu dans les sérums syphilitiques en présence du péréthynol (1).

Nous avons pu microphotographier quelques-uns de ces floccules d'AgCl pour différentes concentrations.

INFLUENCE DU MILIEU.

Nous avons dû entreprendre divers essais pour rechercher le milieu optimum de floculation dans les conditions que nous nous étions fixées. De nombreux travaux antérieurs (2) avaient déjà établi la nécessité d'opérer en milieu acide nitrique pour précipiter le chlorure d'argent ; on sait, d'ailleurs, d'une façon générale, que la présence d'électrolytes accélère la floculation du chlorure d'argent, SO^4 , H^2 , NO^3H , NO^3K , etc.

Nous nous sommes arrêté, après diverses recherches, à une concentration en NO^3H de 5 %, ayant remarqué que dans ces conditions, le chlorure d'argent floccule, tandis que l'emploi de NO^3H concentré détermine une action trop brutale qui empêche une démarcation nette entre la floculation et la précipitation. CLARK WELLS l'avait déjà indiqué en notant que « floculation et coagulation (ou précipitation) sont étroitement liés et qu'à la vérité, on ne peut éliminer les deux phénomènes, la floculation étant le stade qui précède la coagulation ».

En outre, la lumière noircit le floculum en présence d'acide azotique concentré et de ce fait, les lectures se trouvent faussées.

INFLUENCE DES ÉLÉMENTS RÉAGISSANTS.

Il est nécessaire d'opérer avec un excès de précipitant, c'est-à-dire d'azotate d'argent. Nous employons 1/10 de centimètre cube

1. Cf. Publications du D^r A. Vernes.

2. WELLS, *Am. Ch. Journ.*, t. XXXV, p. 99.

de nitrate d'argent N/10. Cette quantité est nécessaire et suffisante pour flocculer nos solutions de NaCl de concentration comprise entre 0 gr. 01 pour 1.000 à 1 gr. 20 pour 1.000, limites dans lesquelles il est toujours facile de se maintenir dans la pratique, comme nous le montrerons dans la suite.

La réaction est du type :



Faisant intervenir les masses moléculaires, nous constatons que :

17 gr. de NO^3Ag réagissent sur 5 gr. 85 de NaCl.

1 cm^3 de NO^3Ag N/10 précipite 1 cm^3 NaCl N/10; ou considérant les masses moléculaires, on a :

0 gr. 017 de NO^3Ag réagit sur 0 gr. 00585 de NaCl. Dans le cas de 1/10 de cm^3 , on a :

0 gr. 0017 de NO^3Ag précipite 0,00585 NaCl.

Or, nous opérons dans le cas maximum sur une solution de NaCl de 1 gr. 20 par litre dont nous prenons 1/10 de cm^3 qui contiennent :

0,000120 de NaCl.

Par conséquent, en utilisant, comme nous l'avons indiqué, 1/10 de centimètre cube de NO^3Ag N/10, c'est-à-dire 0 gr. 0017 qui précipitent théoriquement 0 gr. 000585 de NaCl, nous opérons avec un excès de 5 fois environ.

Nous rejoignons ici MULDER et STASS qui ont indiqué la nécessité d'un excès de précipitant, le premier d'au moins 4 fois et le deuxième 3 fois.

Dans ces conditions, nous avons l'excès requis de précipitant pour une précipitation rapide et totale, en même temps qu'il est loin de l'ordre de grandeur (1.000 fois), qui risquerait d'entraîner une légère dissolution en AgCl, ou la formation d'un complexe soluble (1).

INFLUENCE DE LA LUMIÈRE.

On aura intérêt à opérer avec une lumière d'intensité moyenne. La lampe de VERNES, réglée à 8 volts au moyen du rhéostat disposé à cet effet, donne de bons résultats. L'œil, en effet, apprécie

1. *Am. Ch. Journ.*, t. 35, p. 99.

plus exactement les intensités moyennes et, de plus, de trop fortes intensités risquent de noircir le flocculum.

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE.

La température optima est celle du laboratoire (15 à 18 degrés), car la vitesse de précipitation est fonction de la température. La température déterminant le grossissement des grains, l'élever serait restreindre encore le temps de lecture.

ADAPTATION DU PHOTOMÈTRE A LA CHLORURIMÉTRIE.

ETABLISSEMENT DE LA COURBE.

Dans les conditions d'expérimentation que nous avons définies, à une certaine concentration d'une solution de chlorures, correspond pour cette solution une densité optique, lisible au photomètre. La construction d'une courbe en coordonnées rectangulaires, chaque point ayant pour abscisse la densité optique et pour ordonnée la concentration, nous permet de déterminer à tout moment la concentration en chlorure qui correspond à une densité optique donnée.

Pratiquement, nous avons construit la courbe de graduation de la façon suivante :

Des solutions de NaCl chimiquement pur, dans de l'eau bi-distillée de $P_H = 7$, de concentrations différentes et progressives ont été faites par pesée à la balance de précision, et contrôlées par titrages volumétriques.

L'acide nitrique employé était redistillé et chimiquement pur.

L'azotate d'argent, chimiquement pur, était employé en solution décimale dans l'eau bi-distillée de $P_H = 7$.

Les cuves à réaction étaient parfaitement sèches, propres et rincées à l'eau bi-distillée.

Les proportions de réactifs employés étaient les suivantes :

Solution de NaCl à X pour 1.000	1/10 de cm^3
NO^3H à 5 %	1 cm^3
Agiter et ajouter :	
NO^3Ag N/10.....	1/10 de cm^3

Agiter soit avec une fine baguette de verre ou par secousse de la cuve.

Pour chaque concentration étudiée, le chiffre retenu pour la densité optique était évidemment celui qui correspondait au plateau.

Dans tous les cas, la meilleure lecture, comme il a été déjà indiqué, se fait aux environs de la deuxième minute (de 1 à 3. minutes).

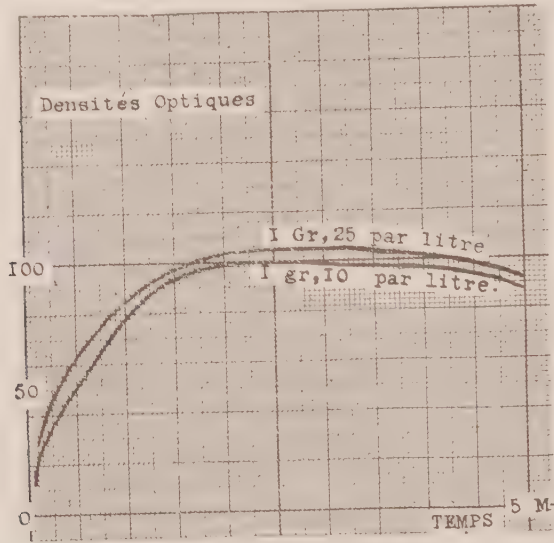


Fig. 18. — Courbe de vitesse de précipitation en fonction du temps.
Mesures faites à l'appareil VERNES, BRICQ, YVON.

Voici, à titre d'exemples, quelques-uns des résultats obtenus :

A) Solutions de même concentration. Lectures faites dans les mêmes intervalles de temps.

Concentration :

Solution de NaCl à 1 gr. 20 pour 1.000 Densités optiques.....	106	} Moyenne 108
	110	
	107	

Concentration :

Solution de NaCl à 0 gr. 50 pour 1.000 Densités optiques	23	} Moyenne 24
	24	
	25	

Concentration :

Solution de NaCl à 1 gr. pour 1.000 Densités optiques	93	} Moyenne 95
	95	
	94	

Cette lecture ayant été faite après une minute d'abandon de la réaction.

B) *Temps.* — Il était nécessaire de contrôler l'influence du temps sur la lecture, la concentration restant la même.

Concentration :

Solution de NaCl à 1 gr. 10 pour 1.000.

Temps de contact	Densité optique
30 secondes	80
1 minute	95
1 m. 30	95
2 m.	98
2 m. 30	100
3 m.	100
3 m 30	97
4 m.	93
4 m. 30	90
5 m.	88

Chaque chiffre indiqué pour la densité optique est une moyenne de lectures faites avec différentes solutions de même concentration, de façon à rendre minimum l'influence de l'erreur de pesée.

Les valeurs indiquées pour les densités optiques représentent la densité optique vraie telle que nous l'avons déjà définie, à savoir la différence entre la densité optique de l'opalescence de la

suspension lue au photomètre et la densité optique du milieu suspenseur.

Comme on le voit, le maximum de précautions ont été prises pour assurer la plus grande exactitude à la courbe: chaque abscisse correspond à une moyenne d'un grand nombre de vérifications expérimentales qui ont eu pour but de réduire autant que possible les erreurs, erreurs dues aux pesées, aux variations dans le moment d'observation et à l'appréciation individuelle. Remarquons d'ailleurs qu'en ce qui concerne cette dernière erreur, elle est, d'après VERNES, de l'ordre de 3/100 dans la graduation de l'appareil VERNES, BRICQ, YVON.

REMARQUE SUR LA PRÉCIPITATION DU CHLORURE DE SODIUM A DE FORTES OU A DE TRÈS FAIBLES CONCENTRATIONS. — L'objection immédiate qui s'impose, c'est que le dosage des chlorures par lecture de la densité optique d'une opalescence d'AgCl au photomètre et la recherche sur notre courbe de la masse de chlorure qui lui correspond, n'est possible que dans les limites de concentration assignées : 0 gr. 05 à 1 gr. 20 pour 1.000 en NaCl.

Dans tous les cas, où l'on se trouve en dehors de ces limites, il sera facile d'y revenir par dilutions.

I. *La teneur en chlorure est inférieure à 0 gr. 05 pour 1.000.* — Nous opérerons comme il suit :

NaCl à X pour 1.000.....	1 cm ³
NO ³ H à 50 %.....	1/10 cm ³
NO ³ Ag N/10.	1/10 cm ³

C'est-à-dire que nous avons fait subir à la technique générale précédemment indiquée les modifications suivantes :

Proportion de solution de NaCl 10 fois plus forte en volume, proportion de NO³H 10 fois moindre en volume, mais acide de concentration 10 fois plus grand (1), de telle sorte que nous sommes revenus aux conditions expérimentales requises par le photo-

1. L'expérience nous a montré que dans cette solution, la concentration de l'acide azotique, qui est le flocculant, apportait des troubles dans le rythme de précipitation, l'étude de cette question sera faite plus loin.

mètre. Il suffira de diviser par 10 le chiffre indiquant sur la courbe la teneur en chlorures.

II. *La concentration en NaCl est supérieure à 1 gr. 20.* — Il suffit, dans ce cas, de diluer la solution à doser au 1/10 dans de l'eau bi-distillée, d'appliquer la technique générale :

Solution de NaCl diluée en 1/10	1/10. cm ³
NO ³ H à 5 %	1 cm ³
NO ³ Ag N/10:	1/10 cm ³

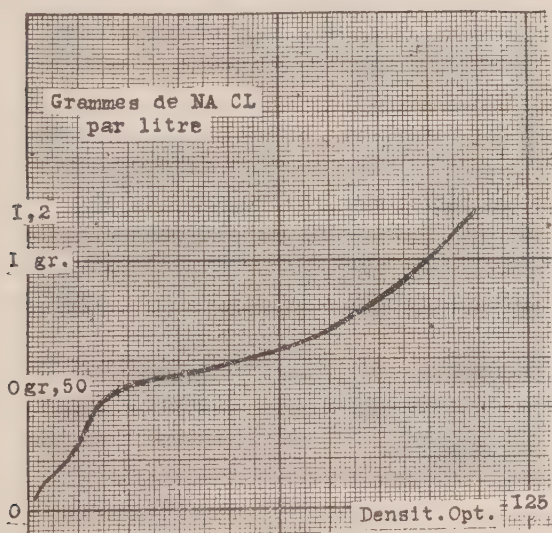


Fig. 19. — Courbe de dosage opacimétrique des chlorures en milieu nitrique fort. Echelle réduite obtenue à l'appareil VERNES, BRICQ, YVON.

La teneur en chlorures trouvée sur la courbe sera multipliée par 10.

En résumé, nous venons de préciser *une technique de dosages néphélométriques des chlorures, par le photomètre VERNES, BRICQ, YVON et construit une courbe permettant de faire correspondre aux densités optiques lues sur l'échelle de l'appareil les masses correspondantes de chlorures.* La courbe est établie dans les limites de concentration 0 gr. 05, 1 gr. 20, dans le cas de concentration inférieure ou supérieure ; la dilution au taux convenable de la solution à titrer,

permet très aisément de revenir aux conditions requises pour l'utilisation du photomètre et de notre courbe. Cependant cette dilution avec variation de la concentration en acide azotique apporte des causes d'erreur que révèle l'examen microscopique des flocculum.

INTERPRÉTATION DE LA COURBE OBTENUE. EXAMEN MICROSCOPIQUE DES GRAINS PRÉCIPITÉS. — La courbe obtenue ne montre point la densité optique comme une fonction continue de la concentration. Elle présente, en effet, pour des concentrations comprises entre 0 gr. 15 à 0 gr. 65 par litre une absorption plus faible que dans les autres concentrations ; cette perturbation dans la précipitation pouvant avoir des inconvénients dans la pratique, nous avons recherché sa cause. Si on pratique des examens microscopiques ou ultramicroscopiques des préparations de chlorure d'argent à diverses concentrations, on voit un trouble dans l'état des grains pour les concentrations comprises entre 0 gr. 15 et 0 gr. 65 environ, le grain est rapidement floclé, il s'assemble vite et quand on prend la densité optique de ces préparations à divers temps depuis son optimum, on voit que la densité optique tombe vite, ce qui va de pair, si les grains se rassemblent et tombent, l'opacité diminue.

Si la concentration en NO^3H varie, le phénomène de flocculation se déplace avec la concentration en flocculant ; plus l'acidité est forte, plus le grain grossit vite et sédimente ; l'emploi d'un acide plus dilué corrige l'irrégularité de la précipitation. Il faut penser, croyons-nous, qu'en faible concentration en chlorure de sodium, il y a en présence une forte proportion de flocculant agissant vis-à-vis du flocculum, proportion qui diminue quand la concentration en chlorure augmente. L'action du flocculant est ménagée alors. Il va de soi qu'en présence de fortes proportions de floclé et de flocculant, les grains sont gros et tombent vite. Pour avoir une flocculation d'opacité croissante avec la concentration, nous avons cherché à avoir des grains tels que le produit Nd (N. étant le nombre, d le diamètre), soit une fonction continue de la concentration.

Pour cela : 1^o il faut des grains ou des amas de grains de grosseur constante pour les diverses concentrations pendant un temps donné, le nombre étant variable.

2^o Il faut rendre plus stable le flocculum, la chute des grains commençant trop rapidement avec un flocculant NO^3H à 5 pour cent,

une bonne stabilité donnant un large temps de lecture optique et permettant d'élargir la courbe.

Pour ce double but, nous avons diminué la concentration en acide azotique et augmenté la viscosité du milieu en y ajoutant de la glycérine à 30° Be, pure et neutre. Après une série d'examens analogues à ceux pratiqués au début de ces mesures, les proportions suivantes ont été adoptées :

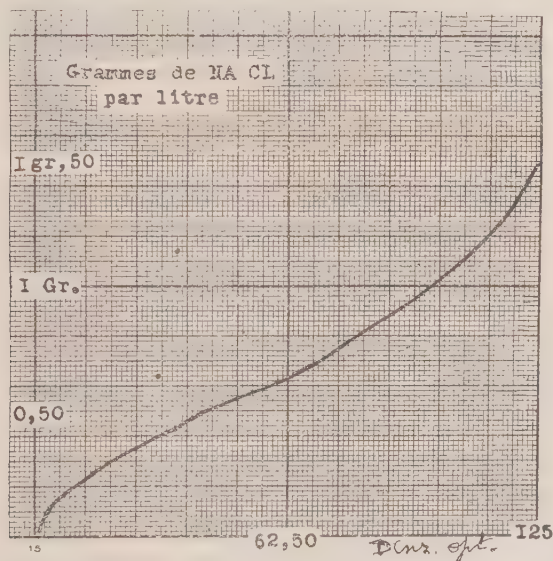


Fig. 20. — Courbe de dosage optique par absorption des chlorures au moyen du Photomètre VERNES, BRICQ, YVON, en milieu nitrique. Glycérine.

Milieu interglandulaire :

Solution normale d'acide azotique	30 cm ³
Glycérine pure à 30° Baumé.....	500 cm ³
Eau distillée.....q. s.	600 cm ³

La solution azotique obtenue doit être vingtième normale.

Mettre en réaction :

Solution de chlorure de sodium à X pour 1.000.	1/10 cm ³
Milieu intergranulaire.....	1 cm ³
Solution de NO^3Ag $\frac{\text{N}}{10}$	1/10 cm ³

VITESSE DE PRÉCIPITATION.

Elle est moins rapide qu'avec le milieu précédemment utilisé et plus régulière.

Des mesures optiques ont été faites sur les précipités obtenus à concentrations suivantes :

1° Concentration en NaCl de 0 gr. 50 par 1.000 cm³.

Le maximum d'opalescence est atteint au bout de 3 minutes et se maintient régulier pendant 3 minutes. La stabilité est plus grande qu'avec le précédent milieu. Chiffres lus au photomètre VERNES, BRICQ, YVON.

	Densité optique réelle
Au bout de 3 minutes	40
— 4 m.	45
— 5 m.	45
— 6 m.	45-45,5

2° Concentration de 1 gr. 10 pour 1.000 .

Le maximum d'opalescence est atteint en 2' il persiste 2 à 3 minutes, puis décroît lentement.

3° Concentration de 1 gr. 20 pour 1.000.

Même observation.

4° Concentration de 1 gr. 50 pour 1.000.

Le maximum d'opalescence est atteint rapidement en 1 minute, mais persiste pendant 4 minutes environ. Pas de sédimentation rapide grâce à la viscosité du milieu. Il est encore possible de faire une bonne mesure à ce taux.

CONSTRUCTION DE LA COURBE.

Nous avons donc construit une courbe avec les proportions suivantes de réactif :

Sol. de NaCl de 0 gr. 10 à 1 gr. 50 p. 1.000 cm ³	0 cm ³ 10
Milieu intergranulaire nitrique-glycérine	1 cm ³
NO ³ Ag $\frac{N}{10}$	0 cm ³ 10

La courbe obtenue montre que l'absorption est une fonction

continue de la masse opalescente. Nous utiliserons donc un milieu visqueux à la glycérine, peu riche en flocculant, *le milieu préparé devra être le même pour les mesures aux diverses concentrations.*

Applications au dosage des chlorures dans l'eau.

Le dosage est d'usage courant, soit pour déterminer le titre d'une solution chlorurée, soit dans les analyses chimiques des eaux de consommation.

Solutions utilisées :

1^o Solution de NO^3Ag $\frac{n}{10}$.

2^o Milieu intergranulaire.

3^o Solutions de NO^3H à diverses concentrations.

APPLICATIONS. — Pour voir les résultats de la méthode préconisée ici, nous avons réalisé un grand nombre de dosages optiques de chlorures dans les eaux de consommation. Notons ici encore que nous avons eu des erreurs très importantes pour les milieux à petite concentration en NaCl où nous employions un flocculant, acide dix fois plus fort que dans les fortes concentrations en sel, ce qui changeait le rythme de flocculation.

Rappelons brièvement le cours de nos expériences sur les eaux de consommation :

PREMIÈRE TECHNIQUE.

Voici ce que nous écrivions d'abord :

La technique à employer dépendant de la concentration en chlorures, on devra dans une première expérience évaluer l'ordre de grandeur de cette concentration.

D'une façon générale, on procède comme si la concentration se trouvait comprise entre 0 gr. 05 et 1 gr. 20 par litre. Trois cas sont alors possibles :

1^o La concentration est effectivement comprise dans ces limites c'est-à-dire que le chiffre de la densité optique absolue indiqué par le photomètre est situé entre 5 et 108.

2^o La densité optique absolue est supérieure à 108. Dans ce cas,

la concentration est supérieure à 1 gr. 20, et une dilution de la solution à examiner au 1/10 dans l'eau distillée est nécessaire. La technique de précipitation restant la technique générale. Le chiffre lu sur la courbe pour la concentration sera multiplié par 10.

3° La densité optique absolue est inférieure théoriquement à 5, à cause de la difficulté de lecture dans cette zone, la concentration est alors intérieure à 0 gr. 05, et pour revenir aux limites appréciables, l'artifice de technique déjà signalé sera employé (1), à savoir :

Eau à analyser	1 cm ³
NO ³ H à 50 pour cent	0 cm ³ 10
NO ³ Ag N/10	0 cm ³ 10

agiter, abandonner 2 minutes, agiter de nouveau et lire.

De cette façon, la densité optique obtenue sera celle d'une solution 10 fois plus concentrée. Le chiffre des concentrations correspondant de la courbe devra donc être divisé par 10.

Dans le cas de l'analyse des eaux de consommation, on pourra d'ailleurs sans tâtonnements appliquer directement cette dernière méthode, la teneur en chlorures de ces eaux étant le plus souvent et dans les cas de potabilité, d'un ordre de grandeur inférieur à la limite minima de notre courbe.

SECONDE TECHNIQUE.

Le mode d'opérer exposé ci-dessus donne de bons résultats aux concentrations moyennes de 0,60 à 1 gr. En dessous de la teneur de 0,60 par litre, les résultats étaient moins bons ; enfin l'emploi d'acide azotique concentré pour les floculations de faibles quantités de chlorures, bouleversait le rythme de floculation en dehors de celui établi avec un flocculant acide de concentration moyenne.

L'observation microscopique de telles préparations nous a fait contrôler ce qui avait été vu, puis mesuré optiquement au photomètre.

Les remarques pour ces mesures sont celles déjà faites avec la solution de chlorure de sodium dans l'eau distillée ; nous avons

1. Il est impossible d'employer ici la technique avec liquide intergranulaire, comme il sera dit plus loin.

done employé le milieu intergranulaire glycérine-acide-nitrique vingtième normal.

EMPLOI DU MILIEU INTERGRANULAIRE.

Technique. — Il faut d'abord tenir compte de la teneur des eaux de consommation en NaCl, on voit qu'elle tient dans les limites de la courbe construite. Mesurer dans une petite cuve (cuve de 1 cm³ 5 ou cuve de l'appareil VERNES-BRICQ-YVON), dans l'ordre :

Eau.....	1/10 cm ³
(agiter 5-6 fois doucement)	
Milieu	1 cm ³
(agiter 6 fois doucement)	
Solution de nitrate d'argent décinormale....	1/10 cm ³

Résultats. — Après un grand nombre de mesures, on peut conclure qu'ils sont voisins de ceux obtenus avec la solution de chlorure dans l'eau pure, et s'en éloignent d'autant plus que l'eau est plus chargée d'autres éléments et en particulier de matières organiques. Voici, à ce sujet, un petit tableau schématique tiré au hasard dans une liste d'analyses.

Eau avec 0 gr. 60 de NaCl par litre	D ^o
Matières organiques 0,015 milieu acide	} 56
Nitrate 0,10 p. litre	

Eau à 0,60 NaCl	
Mat. Org. 0,035	} 45
Nitrate 0 gr. 50	

NOTATIONS DE L'ERREUR DE MESURE. DOSAGE DES CHLORURES.

Les mesures faites donnent une erreur maxima de 6 %, en utilisant le photomètre de VERNES, BRICQ, YVON, l'erreur optique de 3 % étant comprise dans ce chiffre. Nous avons pensé bon d'exprimer graphiquement cette erreur par une surface où se trouvent réunis tous les points lus.

La courbe tracée exprime la moyenne des densités optiques

qu'il est possible de lire pour une concentration donnée et donne une idée nette du degré d'exactitude obtenu.

Pour l'appareil de BAUDOUIN et BÉNARD, l'erreur est plus élevée, nous l'exprimons à 8 %, ceci dû, comme nous l'avons signalé, à une extinction jamais nette, mais entourée d'une frange ; il y a deux zones de demi-extinction entourant un point qui paraît être

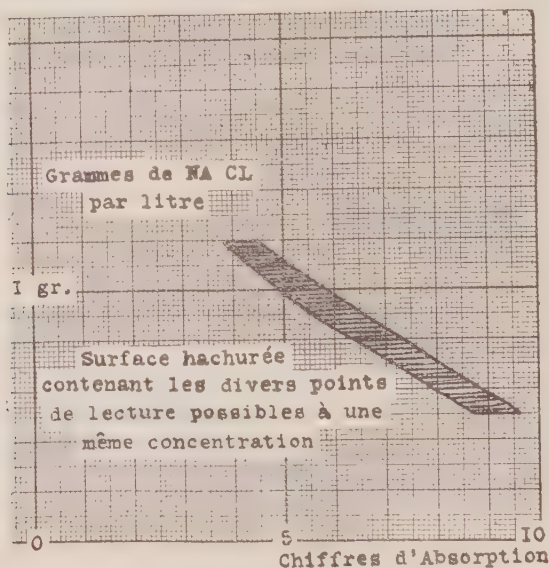


Fig. 21. — Courbe de dosage optique par absorption des chlorures, au moyen de l'appareil de MM. BAUDOUIN et BÉNARD. Milieu nitrique. Glycérine.

l'extinction, mais point déterminé d'une façon variable, suivant l'observation.

De plus, nous avons remarqué que les résultats avec l'appareil de BAUDOUIN-BÉNARD sont meilleurs aux concentrations fortes.

En résumé, des résultats satisfaisants égaux ou supérieurs aux méthodes volumétriques ont été obtenus avec le photomètre VERNES, BRICQ, YVON. Il faut remarquer aussi que les causes d'erreur sont réduites au minimum. Nous allons voir s'il en est de même avec l'urine, le sang, le liquide céphalo-rachidien.

B. — Dosage des chlorures dans l'urine.

L'élimination des chlorures présente un grand intérêt au point de vue clinique, d'où la fréquente nécessité du dosage de ces sels. Quantitativement, ils sont exprimés en chlorure de sodium ; la concentration de l'urine en NaCl est le plus souvent de 5 à 12 gr. par litre. Il en résulte qu'on opérera le dosage optique par dilution.

CONSIDÉRATIONS SUR LES COMPOSANTS DE L'URINE ET L'ACTION DU NITRATE D'ARGENT.

Un certain nombre d'éléments urinaires sont susceptibles de précipiter par le nitrate d'argent. Les phosphates, sulfates, les urates, les chlorures. Les sels d'argent des acides phosphorique et sulfurique ne se forment pas en milieu acide par l'acide azotique. L'urate d'argent ne se forme pas dans un tel milieu, au contraire, l'acide urique floccule et on peut le filtrer pour le séparer, (méthode employée par HEINTZ pour le doser), on l'entraîne par absorption au moyen du kaolin ou du charbon, méthode que nous emploierons. Seul, en définitive, le chlorure d'argent floccule ; ce sont les seuls grains que l'on dose au photomètre. Parmi les éléments anormaux, pathologiques, que l'on peut rencontrer dans l'urine, seule l'albumine pourrait avec notre milieu nitrique glycéline créer une surfloculation au flocculum de chlorure d'argent ; c'est pourquoi il est nécessaire de rechercher l'albumine pathologique et de l'éliminer comme nous l'indiquerons, avant de précipiter les chlorures en milieu faiblement nitrique. Il en sera de même, dans tous les milieux albumineux, lait, liquide gastrique, sérum, liquide de plèvre ; nous avons spécialement étudié cette élimination par destruction de l'élément organique au moyen du permanganate sulfurique et avons publié les principes essentiels de cette méthode (1). Cependant que dans ce même temps, M. LAUDAT (2) publiait sa technique de destruction des albumines du sérum, où nous avons puisé pour perfectionner la nôtre. M. RAQUET (3) a étendu la méthode pour le dosage des chlorures du lait, et tout dernièrement pour le dosage

1. TAILLANDIER (M.) et LEROY (D.), *Société de Biologie*, juillet 1927.

2. LAUDAT, *J. de Pharmacie et Chimie*, 1927, t. I, p. 108.

3. RAQUET, *Ann. des falsifications*, 1927, p. 580 et *J. de Pharmacie et Chimie*, 1928, t. II, p. 489.

des chlorures du suc gastrique ; il a ensuite préconisé la défécation au ferrocyanure de zinc, conseillée par CARREZ.

De nos travaux et de ces diverses techniques, nous avons cherché à produire la meilleure technique qui permette de réaliser la flocculation du chlorure d'argent dans un milieu où les causes d'erreur soient éliminées, dont les constituants soient connus, les propriétés physiques définies (1). Nous opérons ainsi :

S'assurer que l'urine est ou n'est pas albumineuse, par les procédés qualificatifs courants.

A. — *L'urine ne contient pas d'albumine.*

La technique à suivre est celle-ci :

Si l'urine est trouble, la filtrer sur papier, puis l'agiter avec un peu de kaolin chimiquement pur et filtrer sur papier à nouveau. Le filtrat est dilué au 1/10 dans l'eau distillée. Pour éviter les erreurs dues aux manipulations, mesurer 10 cm³ du filtrat à la pipette à double trait, et compléter à 100 cm³ dans un matras jaugé de 100 110 cm³.

L'urine ayant une coloration propre, donc une densité optique déterminée, une première détermination consistera à évaluer cette densité optique. Pour cela, une première lecture sera faite, qui portera sur le mélange suivant :

Urine diluée au 1/10	1/10 cm ³
Milieu intergranulaire.....	1 cm ³

La lecture étant faite, on ajoutera :

N ⁰ 3Ag N/10	1/10 cm ³
-------------------------------	----------------------

Agiter, abandonner 2 minutes et procéder à la seconde lecture.

Le chiffre trouvé pour la densité optique sera alors diminué de celui trouvé dans la première lecture, et représentera la densité optique vraie de l'opalescence due aux chlorures.

L'ordonnée qui sur la courbe correspond à cette abcisse sera

1. Le mieux serait, comme nous l'avons fait pour les autres éléments à doser, d'extraire ces corps par une méthode physique ou chimique. Ici ce serait long et fastidieux et les résultats non supérieurs à ceux obtenus par notre procédé.

naturellement multipliée par 10, puisqu'on est parti d'une urine diluée au 1/10.

Dans le cas d'une concentration en chlorures supérieure à 12 gr. ce que la lecture de la densité optique indiquera immédiatement augmenter simplement la dilution de l'urine.

Dans le cas contraire d'une concentration inférieure à 1 gr. 20, opérer sur l'urine telle.

B. — *Cas d'une urine albumineuse.*

Par sa concentration en chlorures et sa nature albumineuse, ce cas peut être assimilé au dosage des chlorures du liquide céphalo-rachidien et du sang.

Résultats. — Les résultats pour les urines non albumineuses sont comparables à ceux obtenus avec les solutions de NaCl pur, l'erreur est de 4 à 5 %. Avec les urines albumineuses, elle est de 6 % environ.

C. — *Dosage des chlorures dans le liquide céphalo-rachidien.*

La concentration du liquide céphalo-rachidien en chlorures est généralement de 6 à 7 grammes, elle peut varier de 4 à 10 grammes par litre, dans les cas pathologiques.

Le dosage des chlorures se fera donc selon la technique suivante :

Technique. — L'albumine normale du liquide céphalo-rachidien sera détruite par l'acide nitrique $\frac{N}{20}$ en présence de permanganate de potasse.

Trois phases sont à indiquer dans la technique :

1^o Dilution du liquide.

Prendre :

1 cm³ de liquide céphalo-rachidien

et ajouter :

1 cm³ NO³ H $\frac{N}{2}$

et

0 cm³ 50 MnO⁴ K à saturation

chauffer à ébullition douce jusqu'à décoloration, compléter à 10 cm³ avec 3 cm³ 50 de glycérine à 30° Be. Filtrer ou centrifuger. Effectuer une première lecture au photomètre.

2° Mesurer exactement avec une pipette à double trait.

Filtrat 0 cm³ 10

Ajouter :

NO³Ag N, 10 0 cm³ 10

H²O 1 cm³

3° Agiter et lire après 2 minutes de contact.

Ce chiffre obtenu représente la densité optique totale.

En retrancher la densité optique du liquide suspenseur préalablement mesurée.

La concentration correspondante sera multipliée par 10.

Dans le cas d'urines albumineuses, opérer exactement de la même façon, soin ayant été pris de les diluer convenablement.

Le chiffre trouvé pour la concentration sera multiplié par le coefficient de dilution.

Résultats. — 1° Si l'on considère les résultats de trois ou quatre dosages d'une même préparation, on constate toujours une erreur en plus ou moins de 5 à 6 % de la teneur véritable. Nous avons trouvé bien de représenter ces limites d'erreur graphiquement par une surface courbe, qui donne une idée nette du résultat.

2° Si l'on fait des dosages répétés dans un même liquide qui a reçu des quantités croissantes de chlorure de sodium, on retrouve les quantités ajoutées avec une erreur qui ne dépasse pas de 4 à 5 pour cent.

D. — Dosage des chlorures dans le sang.

Le taux normal des chlorures dans le sang est de 6 gr. par litre environ.

La défécation du sang est opérée par adaptation de la technique de MM. LAUDAT et RUDZNYAK.

Prendre 1 cm³ de sérum dans un tube à essai, ajouter 3 cm³ d'une solution de MnO⁴ K à saturation et NO³H N/2 5 cm³.

Porter par chauffage progressif à l'ébullition qui sera prolongée jusqu'à obtention d'un liquide clair.

Au cas où le liquide conserverait une teinte rosée, ajouter une trace de glucose pour le décolorer.

Laisser refroidir et transvaser, en filtrant dans une fiole jaugée de 10 cm³.

Compléter à 10 cm³ avec de la glycérine.

Prélever 1/10 de la liqueur ainsi obtenue.

Ajouter d'abord :

H²O dist..... 1 cm³

Lire la densité optique.

Puis :

NO³Ag N/10 1/10 cm³

Faire la lecture après 2 minutes de contact.

La différence entre les deux lectures donnera la densité optique vraie, de laquelle la valeur de la concentration sera déduite sur la courbe.

Le chiffre trouvé sera multiplié par 10 et indiquera la concentration réelle du sang en chlorure de sodium.

N.-B. — Il est possible d'opérer sur le plasma, sous certaines conditions de prélèvement : ponction veineuse à l'aide d'une seringue enduite d'huile de vaseline, puis addition d'oxalate neutre de potassium et centrifugation.

Il va de soi que la méthode peut être généralisée et étendue au dosage des chlorures dans un grand nombre de substances chimiques et de milieux biologiques, toutes les fois où la réaction au nitrate d'argent est spécifique, au prix peut-être de quelques modifications de technique, et à condition d'être ou de revenir dans les limites de la courbe.

Résultats. — 1^o Résultats de plusieurs dosages dans un même sang. Les chiffres trouvés sont semblables à 4 pour cent près environ. Ils sont situés dans la surface courbe qui schématise les erreurs possibles.

2^o Dans une série de sang à diverses concentrations : l'erreur est de 4 à 6 % de la teneur réelle.

3^o Comparaison avec les autres techniques. Les résultats sont

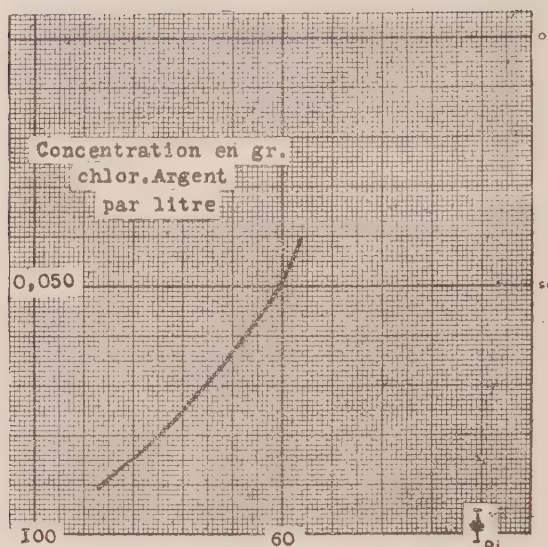


Fig. 22. — Forme de la courbe d'absorption du chlorure d'argent obtenue par MM. CHENEVEAU et AUDUBERT avec le spectrophotomètre FÉRY. Extr. de *Ann. de Phys.*, t. XIII, p. 159. (cure de 8 cm. d'épaisseur),

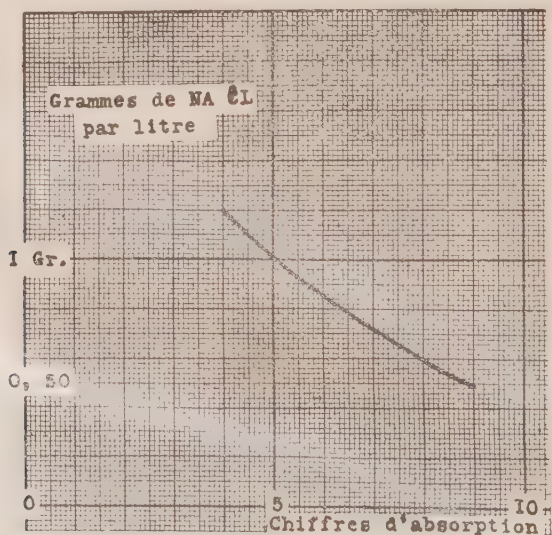


Fig. 23. — « Courbe moyenne » de dosage optique par absorption des chlorures au moyen de l'appareil BAUDOUIN-BÉNARD. Milieu nitrique. Glycérine.

semblables. Nous donnerons des tableaux comparatifs dans un chapitre spécial.

Les résultats obtenus avec l'appareil de MM. BAUDOUIN et BÉ-NARD fonctionnant en lumière monochromatisée sont inférieurs à ceux mentionnés ci-dessus et obtenus avec le photomètre VERNES, BRICQ, YVON ; de plus la zone de lecture est réduite, faits déjà signalés.

CONCLUSION SUR LE DOSAGE DES CHLORURES.

Le dosage des chlorures en solution dans l'eau distillée pure ou contenus dans les eaux d'alimentation réalisé selon la technique préconisée et en milieu nitrique faible donne des résultats égaux et supérieurs à ceux obtenus par volumétrie. De tels dosages pratiqués en série sont rapides. La courbe d'absorption de la lumière est une fonction linéaire croissant parallèlement avec l'élément insolubilisé, le chlorure d'argent.

Le dosage des chlorures fait directement dans les liquides organiques (urines) de composition chimique et de propriétés physiques variables présente des chiffres d'absorption variables suivant le milieu ; l'erreur expérimentale maximum est de 6 pour cent. Nous avons dressé une courbe, moyenne des points obtenus. Les dosages dans les liquides biologiques, après destruction de l'élément organique, donnent des résultats voisins de ceux obtenus dans les dosages des chlorures en solution aqueuse ; la courbe d'absorption est toujours une fonction linéaire de la concentration en chlorures ou très proche d'une telle fonction.

DEUXIÈME DOSAGE

DOSAGE ET MICRODOSAGE DE L'ACIDE URIQUE DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES

Les méthodes de précipitation.

Conditions et modalités d'une précipitation élective.

L'acide urique est, avec l'urée, et aussi les acides animés, un des produits azotés dont l'importance est considérable parmi les éléments des humeurs de l'organisme.

Les travaux de HORBACZEWSKI (1) ont montré que l'acide urique est un produit terminal du métabolisme purique ; de là l'importance clinique considérable de son dosage dans le sang d'une part, et, d'autre part, dans l'urine, dans tous les troubles de ce métabolisme : dans la goutte (2), la gravelle, les néphrites (3), lithiase rénale (4), rhumatisme chronique, l'acidose, les leucémies.

Malgré un grand nombre de travaux faits sur son dosage dans l'urine et dans le sang, la question est restée ouverte aux chercheurs, car la démonstration et l'isolement des diverses formes sous lesquelles l'acide urique se présente dans les humeurs biologiques n'ont point été faites d'une façon définitive (5). Néanmoins, les travaux parus ces dernières années (6) ont éclairé d'un jour nouveau le problème en mettant en relief les formes libres, les formes « copulées », les formes combinées de l'acide urique dans l'urine et dans le sang, ce qui expliquerait les résultats contradictoires des dosages obtenus par les diverses méthodes en usage. Cette question a de l'importance dans notre étude de précipitation élective de l'acide urique par un réactif approprié, susceptible de réaliser une combinaison définie avec le produit à doser.

L'acide urique dans l'urine et dans le sang (7) n'est point tout simplement une solution comme on le croyait jusqu'à ces dernières années, depuis le temps où GARROD, à l'University College l'isolait cristallisé des humeurs de l'organisme par la méthode du fil ; sa forme saline est précipitable sous forme de sel insoluble ; elle existe au taux de 0 gr. 035 par litre dans le sérum et de 0 gr. 35 à 0 gr. 50 dans l'urine ; ces chiffres nous serviront de base pour réaliser la précipitation de l'acide urique.

1. HORBACZEWSKI, Bibliographie.

2. BEZANÇON, *Hyperuricémie. Formes atypiques de la goutte aiguë*, *Presse médicale*, 7 avril 1926.

3. M. P. WEIL, *L'uricémie témoin de l'insuffisance rénale*. *C. R. Soc. de Biol.*, 5 nov. 1921, p. 216.

M. P. WEIL et Ch. O. GUILLAUMIN, *Ac. urique et perméabilité rénale* (*C. R. Soc. de Biol.*, 11 février 1922, p. 319).

4. M. P. WEIL et Ch. O. GUILLAUMIN, *L'augmentation en acide urique combiné du sang humain* (*C. R. S. Biol.*, t. 85, p. 817).

5. *J. médical français*, juin 1924.

6. *J. médical français*, juin 1924.

7. M. P. WEILL et Ch. O. GUILLAUMIN, *Des diverses formes des composés uriques sanguins* (*Paris médical*, 30 déc. 1922, p. 585).

MODES DE PRÉCIPITATION DE L'ACIDE URIQUE.

Pour réaliser la précipitation de l'acide urique et étudier le rythme de floculation d'un de ses sels insolubles, on peut le précipiter à l'état d'urate d'argent, de magnésium, d'urate d'ammoniaque, de cuivre (cuivreux), de zinc.

Sa propriété de donner des sels insolubles avec divers métaux constitue :

1^o Les méthodes dites gravimétriques : précipitation de l'acide urique à l'état de sel d'argent, de zinc, etc. C'est la base des procédés BELLOCQ-SAUZEAT, SALKOWSKI, c'est la base du procédé HAYCRAFT, HERMANN, etc. (1).

2^o Les méthodes volumétriques utilisant la séparation de l'acide urique par précipitation à l'état de sel double d'argent et magnésium (procédé HAYCRAFT-DENIGÈS), d'urate d' NH^3 (HOPKINS-ROUCHÈSE), de sel de cuivre (BLAREZ-FOUWEX-KRUGER) et titrage volumétrique de l'acide urique (2).

Nous avons utilisé ces diverses méthodes : les résultats qu'elles donnent sont différents et leur pratique plus ou moins longue et délicate. Les unes précipitent l'acide urique seul, d'autres le bloc, acide urique et bases puriques (3).

Comme guide dans le choix d'une méthode de précipitation, nous avons le but que nous nous proposons :

1^o Faire un fin précipité électif et total de la matière à doser.

2^o Éliminer toute précipitation adventive diminuant la netteté du dosage.

3^o Opérer dans un milieu où les variables soient éliminées.

L'acide urique étant l'élément donnant seul une combinaison définie avec les métaux, nous éliminerons les méthodes dosant le bloc urique et bases xanthiques d'une façon plus ou moins nette (4).

Il faut éliminer aussi le plus possible tout précipité se présentant finement cristallin. Les variations et les phénomènes se poursui-

1. *Critique des méthodes de dosage de l'acide urique et des corps xanthiques* (*J. de Pharmacie et Chimie*, t. 164, p. 445 et 485, 1921).

2. Cf. *Technique chimique à l'usage des laboratoires médicaux*. A. Morel, chez Doin, 1905.

3. *Critique du dosage de l'acide urique* (*J. de Pharm. et Chimie*, V, 164, p. 445, 485, 1912).

4. *J. de Pharm. et Chim.*, t. XXIII, p. 336, 1906.

vant dans un tel milieu, apportent une cause d'erreur plus ou moins grande suivant le cas envisagé. Le procédé RONCHÈSE à l'urate d'ammoniaque serait donc mal choisi (de même encore pour cette raison, le procédé à l'urate double d'argent et magnésium). Le procédé à l'urate de zinc précipite l'acide urique et en plus les bases xanthiques d'une façon non bien définie. Sa technique manque de clarté (1).

Ayant pratiqué personnellement (2) un grand nombre de dosages dans l'urine par l'urate cuivreux, selon BLAREZ-TOURROU et connaissant bien la technique, ses avantages et ses inconvénients, (erreur par excès, lors du titrage par le permanganate de potasse, de l'urate imprégné de sulfite), l'étude des conditions de précipitation de l'acide urique sous forme d'urate de cuivre a été entreprise en vue de doser le précipité par photométrie et spectrophotométrie.

Le mode de précipitation selon BLAREZ-TOURROU a été le premier expérimenté. Ce sont ces premières recherches qui seront exposées d'abord. Enfin, notons dès maintenant que les résultats obtenus sont exactement superposables à ceux obtenus par titrage, ce qui est capital au point de vue pratique.

Pour des considérations pratiques qui seront exposées plus loin et dans le but d'utiliser par la suite les résultats acquis sur la précipitation de l'acide urique dans les liquides biologiques, nous avons entrepris l'étude du rythme et des conditions de précipitation de l'urate cuivreux. Plusieurs techniques ont été expérimentées, les résultats en seront exposés.

Principe de la méthode de précipitation adoptée

L'acide urique est précipité à l'état d'urate cuivreux, qui se présente comme un flocculum très stable, se formant instantanément, très propre aux dosages néphélométriques.

Première technique, selon Blarez et Tourrou.

On part d'un volume déterminé de liqueur de FEHLING.

On fait agir jusqu'à décoloration une solution de bisulfite de soude qui donne du sulfite cuivreux. Si on fait agir ce sulfite cuivreux

1. SALKOWSKI, SAUZEAT, *loc. cit.*

2. Labor. de Chimie générale à l'Ec. de Médecine de Rennes.

sur de l'acide urique en présence de CO^3Na^3 en excès, on a un flocculum d'urate cuivreux stable pendant plusieurs heures.

CONSTRUCTION DE LA COURBE.

Nous avons réalisé une série de précipitations, avec des solutions de titres variés en acide urique, telles que la densité optique puisse être lue à l'échelle du photomètre VERNES, BRICQ, YVON.

Des recherches sur la sensibilité des réactifs nous ont fait adopter les proportions suivantes :

A. Réactifs.

1. Solution d'acide urique dans l'eau distillée.

Des solutions de concentrations progressives allant de 0 gr. 05 à 2 gr. 50 par litre ont été faites en solution alcaline (par le carbonate de soude).

2. Liqueur de FELHING.

Solution A :

Sulfate de cuivre cristallisé pur.....	10 gr.
Acide sulfurique pur.....	1 cm ³ 25
Eau distillée q. s. p.....	250 cm ³

Solution B :

Sel de Seignette pur.....	50 gr.
Soude caustique	37 gr. 5
Eau distillée q. s. p.	250 cm ³

3. Solution saturée commerciale de bisulfite de soude.

4. Solution de carbonate de soude à saturation dans l'eau distillée.

B. Réaction.

Mesurer dans une éprouvette graduée de 50 cm³ :

Solution A.....	2 cm ³ 5
Solution B.....	2 cm ³ 5

Ajouter goutte à goutte la solution de bisulfite de soude jusqu'à décoloration complète.

Dans une deuxième éprouvette graduée de 30 cm³, mesurer avec une pipette à double trait 15 cm³ de solution d'acide urique.

Ajouter ensuite :

Solution de carbonate de soude..... 2 cm³ 5

Verser ce deuxième mélange dans la première éprouvette, et

Eau distillée q. s. pour compléter à 25 cm³

Agiter et abandonner 1 minute.

Prélever 1 cm³ et mesurer la densité optique.

La densité optique vraie s'obtiendra en retranchant de cette première valeur la densité optique de la solution d'acide urique.

De cette façon ont été déterminés les points de la courbe correspondant aux différentes concentrations en acide urique.

L'état purement colloïdal du flocculum et sa parfaite stabilité rendent très faciles les dosages d'urates et d'acide urique par cette méthode.

I. — DOSAGE DANS L'URINE.

La technique de construction de la courbe s'applique sans modifications.

Il faut avoir soin préalablement de filtrer à *chaud* l'urine à analyser, de vérifier si elle est ou non albumineuse, de la diluer convenablement le cas échéant pour rentrer dans nos limites d'étalonnage en acide urique.

Dans le cas d'urine albumineuse, se reporter à la technique de dosage dans le sérum sanguin (défécation).

II. — DOSAGE DANS LE SÉRUM SANGUIN.

Défécation :

Déféquer le sérum à l'acide trichloracétique à 25 pour cent

Sérum sanguin 15 cm³

Acide trichloracétique à 25 pour cent 15 cm³

Agiter, filtrer et prendre :

Filtrat 15 cm³

En mesurer la densité optique.

Réaction :

Dans une éprouvette de 50 cm³ mesurer :

Solution A.....	2 cm ³ 5
Solution B.....	2 cm ³ 5

Agiter et verser goutte à goutte.

Solution de bisulfite de soude jusqu'à décoloration.

Dans une deuxième éprouvette préparer :

Filtrat	15 cm ³
Solution saturée de carbonate de soude ..	2 cm ³ 5

Verser le contenu de la deuxième éprouvette dans la première, et ajouter :

Eau distillée q. s. pour	25 cm ³
--------------------------------	--------------------

Agiter, attendre 1 minute et faire la détermination optique.

La densité optique vraie s'obtiendra en retranchant de cette valeur, la densité optique précédemment mesurée.

Se reporter à la courbe pour l'obtention du chiffre de la concentration. Ce dernier sera naturellement multiplié par 2.

L'inconvénient de la méthode est évidemment de requérir un volume de sérum de 15 cm³. Pour y pallier, nous avons opéré en micro-analyse, réduisant toutes les proportions au 1/10.

Défécation :

Sérum.....	1 cm ³ 5
Acide trichloracétique à 25 pour cent....	1 cm ³ 5

Agiter et centrifuger dans un tube à hémolyse.

Reprendre :

Filtrat (ou liq. décanté).....	1 cm ³ 5
--------------------------------	---------------------

Ajouter :

Solution de carbonate de soude.....	0 cm ³ 25
-------------------------------------	----------------------

Préparer dans une éprouvette de 5 cm³ bien graduée et vérifiée à la pipette à double trait :

Solution A.....	0 cm ³ 25
Solution B.....	0 cm ³ 25

Ajouter avec une pipette Pasteur très effilée :

Sulfite de soude..... jusqu'à décoloration complète.

Verser ensuite le mélange filtrat plus carbonate de soude.

Compléter avec :

Eau distillée q. s. p. 2 cm³ 5

Déterminer la densité optique vraie et la concentration en acide urique correspondante comme précédemment.

Comme dans toute manipulation de microanalyse, il importe au plus haut point d'être très précis dans toutes les mesures, mais notamment dans celles effectuées avec les pipettes au 1/100.

La méthode de BLAREZ-TOURROU comporte des facteurs (solution de FEHLING, solution bisulfite) susceptibles de variation au point de vue composition et réaction du milieu. De plus, la pratique nous a montré que la manipulation était assez longue, la préparation du sulfite mal définie, laissée au juger personnel, enfin les travaux récents de RANGER sur l'utilisation de l'hyposulfite cuivreux dans le dosage de l'acide urique urinaire et la considération des remarques et des résultats dégagés de ses travaux, nous ont fait étudier la précipitation de l'acide urique par l'hyposulfite cuivreux.

Seconde technique de précipitation selon Ducung et Rangier. -- Rangier et Shelle.

D'abord, voici rapidement la genèse de cette méthode.

ACIDE URIQUE DANS L'URINE.

L'acide urique urinaire, au point de vue de son origine, représente un des termes ultimes de la dégradation des nucléoprotéides dans l'organisme ; il est soit d'origine exogène, s'il provient des nucléoprotéides alimentaires, soit d'origine endogène, s'il provient des nucléoprotéides cellulaires. De plus, il est dans un milieu fort complexe, l'urine, qui contient en suspension colloïdale ou en solution aqueuse les produits de désintégration des molécules qui ont rempli leur fonction vitale. Ainsi de par son origine et de par

l'action de son milieu d'élimination, l'acide urique est susceptible d'exister dans l'urine sous plusieurs états.

Du point de vue général, l'acide urique peut exister sous 3 états :

1° A l'état libre, en suspension ou dissous dans le milieu urinaire.

2° A l'état de sel métallique, l'acide urique étant, comme son nom l'indique, un composé acide.

3° A l'état de combinaison organique associé à un radical ou à des radicaux organiques pour donner un complexe soluble dans l'eau.

RANGIER a répondu à ces 3 questions dans une étude minutieuse et consciencieuse et nous lui empruntons ses réponses.

« 1° L'acide urique ne peut être libre, à cause de sa faible solubilité comparée à la dose moyenne de 0 gr. 50 d'acide urique par litre.

2° L'acide urique n'est pas en combinaison saline, ou il l'est en combinaison infime, ceci à cause de la réaction acide de l'urine, ou dans le cas de précipitation de l'acide urique après émission.

3° On est donc conduit à envisager que l'acide urique est combiné à un groupement ou à des groupements organiques inconnus pour constituer ainsi un édifice moléculaire soluble dans le milieu aqueux urinaire. »

Cette idée a été précisée par l'expérience. C'est DERUDE, en 1891, qui y a le premier travaillé d'une façon nette, en étudiant la méthode défectueuse de dosage de l'acide urique, selon HEINTZ, par action de HCl ; il conclut :

1° La précipitation est longue, en additionnant l'urine d'après le procédé de HEINTZ de 10 pour cent d'HCl pur et concentré ($D = 1.22$), il faut attendre 2 ou 3 jours pour que la précipitation soit achevée.

2° La précipitation de l'acide urique est toujours incomplète.

3° La précipitation est irrégulière ; ce qui cadre avec les notions de saponification, éthérification, hydrolyse des composés organiques.

Ensuite KLEMPERER émet l'avis que l'acide urique est combiné à l'uurochronogène de l'urine. ISCOVESCO dit qu'il est combiné à un colloïde électro-négatif mis en évidence par lui. D'autres disent qu'il est combiné à l'acide thymurique ou aux acides nucléiniques, ou encore un acide animé (1).

1. Prof. CHELLE, Etude sur le dosage clinique de l'acide urique par l'hyposulfite de cuivre. Lab. de Ch. de la Fac. de Méd. de Bordeaux.

RANGIER et CHELLE (1) ont mis en évidence cette partie organique des combinaisons uriques par une méthode intéressante, du fait qu'elle conduit à des conclusions du plus haut intérêt au point de vue analytique. Ayant étendu dans son travail, la précipitation de l'acide urique par l'urate cuivreux, ils concluent : 1^o Il n'y a pas de cuivre précipité sous une autre forme que celle d'urate cuivreux.

2^o Une partie du cuivre passe dans le filtrat, décelable par le réactif au ferrocyanure de potassium acétique, et cela alors même que la quantité de réactif cuprique ajouté à l'urine n'est pas suffisante pour y précipiter l'acide urique ; 3^o Le cuivre solubilisé qui passe dans le filtrat correspond toujours au 1/3 de la partie contenue dans le volume de réactif employé.

« Il nous a paru dit RANGIER, que les faits précédents s'expliquaient fort bien en admettant que l'urine renferme une substance formant avec le cuivre une combinaison soluble qui ne peut être précipitée par l'acide urique. Ce principe solubilisant n'agissant que proportionnellement à la quantité d'acide urique précipité, c'est la seule qui nous permette de donner une explication concordant avec nos expériences. On n'a pu isoler le complexe organique soluble du cuivre (Cf. Rangier. Thèse pour le Doctorat en Médecine, Bordeaux, mars 1923). Mais les modalités de précipitation de l'acide urique, sous forme de l'urate cuivreux, ont permis de réaliser une plus-value totale de l'acide urique et de déterminer la part du copule qui y est attaché dans l'urine.

Lorsqu'on traite une urine quelconque par l'hyposulfite de cuivre, en suivant les prescriptions que nous avons établies pour le dosage des solutions aqueuses d'acide urique, le précipité d'urate cuivreux se produit très facilement et la détermination de l'acide urique est aussi aisée en apparence qu'en solution aqueuse. Si l'on vient toutefois à recueillir le précipité d'urate cuivreux et à déterminer les proportions d'acide urique qu'il renferme précipité par le sel de cuivre, on trouve que 2/3 du sel de cuivre a été précipité par l'acide urique pour 1/3 reste solubilisé.

DUCUNG qui avait observé ce fait dit : « le dédoublement de l'acide urinaire donnerait en présence d'hyposulfite cuivreux 2 équivalents d'acide urique précipitable et un équivalent de substance solubilisante et il ajoutait : « le fait nettement établi qui ressort de tout ce qui précède est que pour tout dosage dans l'urine, c'est un tiers en trop de réactif cuprique que l'on est obligé d'employer avant d'établir la précipitation

1. Prof. MAILLARD, *Cristallis. spontanée de l'acide urique dans certaines urines* (Bull. Soc. Ch. Biol., t. 5, 1923, p. 930).

complète » autrement dit, il faudra augmenter la proportion de sulfate de cuivre. »

Les travaux de DUCUNG et les conclusions qu'il en a tirées ont été minutieusement repris et vérifiés par RANGIER qui, par ses travaux, démontre que le dosage de l'acide urique urinaire par l'hypo-sulfite de cuivre est un des plus précis, des plus rapides, des plus cliniques.

Qu'il précipite l'acide urique seul et en totalité.

Que l'acide urique urinaire, normalement éliminé sous une forme dite copulée qui en assure sa solubilité en milieu acide, est décopulé sous l'action de l'hyposulfite cuivreux en milieu alcalin, avec formation d'urate cuivreux insoluble et en copule cuivreux soluble.

Cette décopulation qui n'est pas complète sous l'action des acides, ce qui explique les erreurs du procédé de HEINTZ, l'est totale grâce à l'action réductrice de l'hyposulfite de cuivre.

Ces travaux ont été poursuivis par CHELLES, en collaboration avec RANGIER, qui ont fait la démonstration des faits cités (cf. Formes d'élimination de l'acide urique urinaire, CHELLES et RANGIER).

Un très grand nombre de mesures de précipitation par le cuivre, selon DUCUNG, ont été faites par RANGIER, en comparaison avec les autres méthodes, celle précipitant l'acide urique seul et celle précipitant le bloc acide urique + corps xantho-uriques.

Les résultats en ont été publiés au *Bulletin de la Société de Chimie biologique* (1).

C'est de tout cet ensemble de données et des résultats représentés dans les divers tableaux reproduits que nous nous sommes inspirés dans notre propre travail.

Précipitation de l'acide urique de l'urine par l'hyposulfite cuivreux.

Puisque nous ignorons la forme sous laquelle se trouve l'acide urique urinaire, nous admettrons simplement qu'il est uni à un radical organique inconnu solubilisant ; examinons ses procédés

1. RANGIER, *Dosage de l'acide urique à l'état d'urate cuivreux* (*Bull. Soc. Ch. Biol.*, déc. 1924).

de dosage et cherchons s'il en existe un ou s'il peut en exister un qui soit à la fois clinique et exact. Les procédés de dosage de l'acide urique sont nombreux, mais deux seulement attirent notre attention ; citons le texte de RANGIER :

« Le premier procédé de dosage (1) qui nous intéresse est celui de SALKOWSKY-LUDWIG modifié, décrit dans le « Précis de Chimie analytique » de DENIGÈS. Il repose sur le principe suivant :

Si on ajoute à une urine un mélange de mixture ammoniaco-magnésienne et d'une solution de nitrate d'argent ammoniacal, il se produit un urate double d'argent et de magnésium insoluble.

Dans cette méthode, la précipitation de l'acide urique est totale, donc la dissociation du complexe urique est complète. En traitant le précipité par du sulfure de sodium, il repasse en solution un urate alcalin et, par évaporation de cette dissolution, on obtient après addition d'acide chlorhydrique l'acide urique cristallisé. Cet acide urique, recueilli sur un filtre et soigneusement lavé à l'eau faiblement sulfurique, est dosé par le permanganate décinormal.

Le deuxième procédé de dosage qui nous intéresse a été décrit, en 1892, dans une courte publication par P. DUCUNG (2). Son titre : *Etude sur le dosage clinique de l'acide urique par l'hyposulfite de cuivre* a attiré mon attention, et ce sont les conclusions expérimentales qu'il renferme qui m'ont servi de base. Ce travail, qui n'a pas été repris, semble aujourd'hui tombé dans l'oubli, aussi allons-nous le passer rapidement en revue.

En 1881, WORM MULLER (3) songea à utiliser l'insolubilité de l'urate de cuivre pour doser l'acide urique ; il opérait à chaud, en présence de liqueur cupro-potassique. Le procédé, assez rapide, manquait toutefois de rigueur.

En 1889, MM. ARTHAUD et BUTTE (4), reprenant avec ingéniosité l'idée de WORM MULLER, proposèrent, pour précipiter l'acide urique, une liqueur ainsi composée :

Sulfate de cuivre.....	1 gr: 484
Hyposulfite de soude.....	20
Sel de Seignette.....	40
Eau distillée.....	Q. S.
pour un litre de solution.	

1. Nous citons le texte de RANGIER, *Bull. Soc., Ch. Biol.*, déc. 1920.

2. Travail du Laboratoire de Chimie de la Faculté de Médecine de Bordeaux, fait sous la direction de M. DENIGÈS.

3. *Ueber das Verhalten der Harnsaure zu Kupferoxyd und Alkali* (*P. flug. Archiv*. Bd. XXVII, 1881).

4. Comptes rendus des séances et Mémoires de la Société de Biologie, 9 nov. 1889.

Dans la pensée des auteurs, il se formerait, par le mélange de ces diverses substances, de l'hyposulfite cuivreux dont la stabilité serait assurée par l'excès du sel de Seignette.

Le titre de cette liqueur est tel qu'un centimètre cube précipite 1 milligramme d'acide urique.

Voici, en quelques lignes, en quoi consiste cette méthode. On précipite d'abord les phosphates à l'aide du carbonate de soude en excès. On filtre et dans 20 centimètres cubes de filtrat, on verse avec une burette de MOHR le réactif jusqu'à cessation de précipité. On s'assure que la réaction est bien terminée en ajoutant de l'ammoniaque qui donne une coloration bleue par agitation à l'air.

DUCUNG vérifia le procédé ARTHAUD et BUTTE avec des solutions aqueuses d'acide urique et, ayant trouvé que sa sensibilité n'avait pas été exagérée (il pouvait en effet déceler 2 centigrammes d'acide urique et même moins en solution dans un litre d'eau), essaya d'appliquer la méthode à l'urine. Il modifia ainsi le procédé d'ARTHAUD et BUTTE et, après une série d'essais comparatifs, adopta les formules suivantes :

SOLUTION A.

Sulfate de cuivre cristallisé pur..... 2 gr. 98

Dissoudre à froid dans 500 cm. d'eau environ, ajouter :

Acide sulfurique	V gouttes	(mesurées avec un tube effilé)
Eau distillée	Q. S.	

pour un litre de solution.

L'addition d'acide sulfurique assure la conservation indéfinie de cette première liqueur.

SOLUTION B.

Hyposulfite de soude	25 gr.
Sel de Seignette	25 gr.

Dissoudre à froid dans :

Eau distillée	Q. S.
---------------------	-------

pour avoir un litre de solution.

Le mélange à volumes égaux de ces deux liqueurs, qui isolément sont inaltérables, précipite 1 milligramme d'acide urique par centimètre cube et se conserve avec son titre pendant au moins huit jours.

SOLUTION C.

Acide urique pur et sec.....	1 gr. 50
Lessive de soude au dixième.....	20 cm.
Solution saturée à froid de carbonate de soude	20 cm.
Eau distillée.....	Q. S.
Pour avoir un litre de solution.	

Diluer l'acide dans environ 500 cm³ d'eau, ajouter la lessive de soude ; lorsque la dissolution est complète, verser la solution de carbonate de soude, puis compléter le volume à 1.000 cm³.

Cette solution C sert de réactif et a servi à DUCUNG en la diluant dans certaines proportions à se rendre compte de l'exactitude de la méthode de dosage et de sa sensibilité. L'addition de carbonate de soude est absolument indispensable ; si l'on verse en effet, le réactif cuprique dans une liqueur tenant de l'acide urique en dissolution à la faveur de la lessive alcaline seule, on constate que la précipitation n'a pas lieu et qu'elle se produit au contraire immédiatement lorsqu'on ajoute un peu de carbonate de soude ; un excès ne nuit pas, pour la solution pure d'acide urique, 20 cm³ pour un litre de liqueur suffisent pour assurer la précipitation complète.

Le dosage s'effectue par la méthode bien connue des approximations successives, celles que l'on utilise par exemple pour le dosage du sulfate de potasse dans les vins par la liqueur chlorhydrique de chlorure de baryum.

Prenons comme exemple l'exécution du dosage dans une solution renfermant 0 gr. 65 d'acide urique par litre.

Technique. — Prélever 10 cm³ de la solution d'acide urique avec une pipette jaugée, verser dans un tube à essais, ajouter dix gouttes de solution saturée de carbonate de soude, puis 5 cm³ de liqueur cuprique. Chauffer légèrement vers 40°, ou encore attendre 10 minutes et filtrer. Séparer le filtratum en deux parties dans deux tubes à essais bien clairs dans le premier tube ajouter 1 cm³ de réactif cuprique. La quantité (5 cm³) de solution cuprique ajoutée dans ce cas ne sera pas suffisante et il se produira immédiatement un trouble dans le tube où, après filtration, on aura versé pour l'essai 1 cm³ de liqueur cuprique ; ce trouble indique qu'il faut employer une quantité de réactif plus considérable.

Recommencer alors la même opération en employant une quantité plus forte de liqueur cuprique, 8 cm³ par exemple. Dans l'un des tubes contenant le filtratum, ajouter de nouveau 1 cm³ de liqueur urique.

Dans ce nouveau cas, la quantité (8 cm³) de solution cuprique est trop grande et l'apparition d'un trouble immédiat dans le tube où l'on aura versé 1 cm³ de liqueur urique indiquera un excès de précipitant.

Par ces deux premières expériences, l'on sait que la quantité d'acide urique contenue dans la solution examinée est comprise entre 0 gr. 50 et 0 gr. 80 ; de même, deux nouveaux essais, faits en employant 6 et 7 cm³ de réactif cuprique, indiqueront aussi nettement que précédemment que cette quantité est limitée entre 0 gr. 60 et 0 gr. 70.

A ce moment pour le cas particulier qui nous occupe, un dernier essai, fait en employant 8 cm³5 de précipitant, prouvera que l'on est arrivé au terme exact par la limpidité qui persistera dans les deux tubes contenant le filtratum, malgré l'addition dans chacun de l'un des réactifs indicateurs.

Une dernière recommandation importante est de ne jamais trop se hâter de conclure. Au fur et à mesure que l'on approche du terme exact, l'apparition de l'opalescence, après addition des réactifs indicateurs, est plus lente à se produire, et aux dernières limites, c'est-à-dire lorsqu'on est à une approximation de 3, 4 ou 5 cgr. par litre en plus ou en moins, il faut, pour obtenir de bons résultats, attendre pendant 5 minutes avant de constater l'opalescence.

Enfin et surtout pour les derniers essais, l'intensité du trouble obtenu après addition soit de liqueur cuprique, soit de solution urique, dans le filtratum, permet de déterminer très approximativement la quantité de précipitant à employer pour la dernière opération.

DUCUNG fait d'abord une série d'essais avec une solution C d'acide urique pur (dont il détermine la teneur en azote par la méthode de WILL et WARENTRAPP), dilué dans les rapports connus, 2/2, 1/2, 1/3, 1/5, 1/10, 1/30, mais en conservant, toutefois, la proportion de carbonate de soude, constante, soit de 2%. Il constate que la dose d'acide urique que renferme une solution aqueuse, en suivant les indications données, est pour ainsi dire absolue (puisque l'erreur maxima était de l'ordre de 1 ctgr.) et que le dosage est encore rigoureux dans une solution ne renfermant plus que 5 ctgr. par litre.

Voici le tableau qui représente ses résultats :

Dose d'acide urique par litre — gr.	Quantité de réactif employé en cm ³ —	Constaté après filtration —	Temps de repos du filtratum additionné de réactif —
	15,2	Excès de précipitant	0 minute
1,50	15	Exact	5 —
	14,8	Excès d'acide urique ...	0 —
	10,2	Excès de précipitant	0 —
1,00	10	Exact	5 —
	9,8	Excès d'acide urique ...	0 —
	7,7	Excès de précipitant	0 —
0,75	7,5	Exact	5 —
	7,3	Excès d'acide urique ...	0 —
	5,2	Excès de précipitant	0 —
0,50	5	Exact	5 —
	4,8	Excès d'acide urique ...	9 —
	3,2	Excès de précipitant ...	0 —
0,30	3	Exact	5 —
	2,8	Excès d'acide urique ...	0 —
	1,7	Excès de précipitant	0 —
0,15	1,5	Exact	5 —
	1,3	Excès d'acide urique ...	0 —
	0,7	Excès de précipitant	0 —
0,05	0,5	Exact	5 —
	0,3	Excès d'acide urique	0 —

Puis il étudie ensuite l'action des phosphates, des sulfates, des chlorures, du carbonate d'ammoniaque, de l'urée, etc... sur son réactif et pour clore cette série d'essais, il opère un dernier dosage d'acide urique avec une urine artificielle ayant la composition suivante par 1.000 cm³ :

Acide urique	1 gr.
Urée	30
Phosphate disodique	4
Sulfate de potasse	2
Chlorure de calcium	0,50
Chlorure de magnésium	0,50
Chlorure de sodium	16,50
Créatine	0,50
Créatinine	0,50
Acide hippurique	0,50
Urochrome et urobiline	Q. S.
pour donner une coloration jaune intense à l'urine.	

Voici les résultats qu'il a obtenus :

Urine artificielle	Quantité de réactif employée	Constaté
10 cm ³	10 cm ³ 2	Excès de réactif
10 —	9 — 8	Excès d'acide urique
10 —	10 —	Exact.

Par la méthode de SALKOWSKY-LUDWIG, il trouve avec la même urine une quantité d'acide urique égale à 0 gr. 988 par litre, alors que sa méthode lui donne la quantité théorique de 10 cm³, soit 1 gr. par litre.

Le procédé de dosage par précipitation, au moyen de l'acide chlorhydrique lui a donné un écart notable ; il n'a retrouvé en effet que 0 gr.935 d'acide urique.

Il applique ensuite son procédé de dosage à l'urine et voici ses conclusions :

Après cette série d'expériences nombreuses, comprenant plus de 100 analyses, dans lesquelles nous avons cru envisager tous les cas possibles et dont la dernière nous paraissait tout à fait concluante, nous pensions que l'application à l'urine du procédé de dosage indiqué était bien justifié et nous nous apprêtions à confirmer simplement, en les appuyant de toutes nos expériences, les affirmations de MM. ARTHAUD et BUTTE, lorsqu'un fait bien inattendu et qui avait complètement échappé à ses auteurs est venu modifier complètement notre opinion, en nous montrant que les méthodes synthétiques sont souvent fort imparfaites quand il s'agit de constituer de toutes pièces les liquides de l'organisme.

Lorsqu'on traite, en effet, une urine quelconque par l'hyposulfite de cuivre, en suivant les prescriptions que nous avons établies pour le dosage des solutions aqueuses d'acide urique, le précipité d'urate cuivreux se produit très facilement et la détermination de l'acide urique est aussi aisée, en apparence, qu'en solution aqueuse, si l'on vient toutefois à recueillir le précipité d'urate cuivreux formé et à déterminer la proportion d'acide urique qu'il renferme, ou encore si l'on effectue le dosage de l'acide urique dans l'urine mise en expérience, par le procédé de Ludwig, on trouve que les deux dernières méthodes donnent des chiffres concordants, mais toujours moins élevés que ceux fournis par les approximations successives, ainsi qu'il résulte du tableau suivant donnant les résultats comparatifs de 19 analyses.

Si, au premier abord, ces chiffres paraissent n'offrir que des écarts sans aucun terme de comparaison, un examen plus attentif permet d'établir que si les différences données par la méthode volumétrique et celle de Ludwig ne sont pas constantes en quantité absolue, elles sont

cependant mathématiquement proportionnelles et qu'en tenant compte des erreurs d'analyses possibles, les chiffres obtenus par le procédé de LUDWIG se confondent toujours avec les deux tiers du nombre donné par la méthode volumétrique.

N° d'ordre des urines	Dosage par la méthode volumétrique gr.	Dosage par le procédé Ludwig	Chiffres calculés en multipliant par 2/3 ceux donnés par la méthode volumétrique	Différence
1	0,78	0,53	0,52	0,25
2	1,55	1,07	1,03	0,48
3	0,76	0,51	0,50	0,25
4	0,24	0,13	0,16	0,11
5	0,48	0,33	0,32	0,15
6	0,49	0,32	0,32	0,17
7	0,45	0,29	0,30	0,16
8	0,97	0,63	0,64	0,34
9	1,07	0,70	0,71	0,37
10	0,84	0,55	0,56	0,29
11	0,40	0,26	0,26	0,14
12	0,56	0,38	0,37	0,18
13	0,51	0,34	0,34	0,17
14	0,46	0,29	0,30	0,17
15	1,11	0,74	0,74	0,37
16	0,58	0,39	0,39	0,19
17	0,45	0,31	0,30	0,14
18	0,86	0,56	0,57	0,30
19	0,70	0,47	0,46	0,23

Nous avons obtenu des résultats identiques chaque fois que nous avons exécuté des dosages comparatifs dans l'urine par ces deux méthodes. Ce fait, nettement établi par l'expérience, nous semble absolument constant ; il nous permet donc de rendre applicable à l'urine une méthode qui, jusqu'à cette heure, ne fournissait que des résultats erronés. Il est toutefois plus difficile d'en donner une explication précise, car le phénomène est tout à fait indépendant des principes de l'urine isolés jusqu'ici et dont nous avons étudié successivement l'action sur le dosage.

Avant d'effectuer ses dosages, DUCUNG précipitait les phosphates en additionnant l'urine du dixième de son volume de carbonate de soude saturé, il filtrait et opérait sur 11 cm³ du filtrat correspondant à 10 cm³ d'urine primitive. DUCUNG démontre ensuite que dans ses réactions :

1° Il n'y a pas de cuivre précipité sous une autre forme que celle d'urate cuivreux.

2° Une partie du cuivre passe dans le filtrat, décelable par le réactif au ferrocyanure de potassium acétique et cela alors même que la quantité de réactif cuprique ajoutée à l'urine n'est pas suffisante pour y précipiter tout l'acide urique.

3° Le cuivre solubilisé qui passe dans le filtrat correspond toujours au tiers de la quantité contenue dans le volume de réactif employé.

Il conclut ainsi :

Il nous a paru que tous les faits précédents s'expliquaient fort bien en admettant que l'urine renferme une substance formant avec le cuivre une combinaison soluble qui ne peut être précipitée par l'acide urique.

Si l'acide urique pouvait en effet, par double décomposition se substituer à ce principe pour former de l'urate cuivreux, la combinaison soluble ne pourrait se former qu'autant que la liqueur contiendrait un excès de réaction cuprique et le cuivre ne pourrait être décelé qu'après la précipitation totale de l'acide urique, ce qui n'est pas ; d'autre part, une solution alcaline d'acide urique ne pourrait servir, comme nous l'avons établi, pour indiquer la fin de la réaction, puisque l'addition de cette liqueur dans le liquide à essayer amènerait toujours fatalement la formation d'un précipité, due à la présence dans le liquide de cette combinaison soluble, pouvant donner lieu à une double décomposition, fait que nous n'avons jamais observé.

Nous ne pouvons envisager cette substance solubilisante que de deux façons : ou elle existe préformée dans l'urine, ou bien elle ne prend naissance qu'au fur et à mesure que l'acide urique passe à l'état d'urate cuivreux.

Dans le premier cas, si la substance existe préformée, comment admettre (qu'elle soit toujours rigoureusement proportionnelle aux deux tiers de l'acide urique vis-à-vis du réactif cuprique.

Si nous admettons le fait malgré tout ce qu'il présente d'étrange, lors de l'addition à l'urine du réactif cuprique, la combinaison soluble du cuivre devrait s'opérer la première et l'on ne devrait constater l'apparition de l'opalescence dans la liqueur qu'au moment précis où cette substance solubilisante serait saturée, soit lorsqu'on aurait employé le tiers du volume de liqueur titré nécessaire pour la précipitation totale ; or, l'expérience démontre que la première goutte de liqueur cuprique versée dans une urine préalablement alcalinisée par le carbonate de soude et filtrée y produit un précipité très net et que, d'autre part, le cuivre peut se retrouver dans le filtratum, si minime que soit la quantité de réactif cuprique employée.

Cette première hypothèse n'est donc pas admissible.

Quant à la seconde, d'après laquelle le principe solubilisant n'agirait

que proportionnellement à la quantité d'acide urique précipité, c'est la seule qui nous permette de donner une explication concordant avec nos expériences.

En effet, tout se passe comme si, dans l'urine, l'acide urique ne se trouvait ni à l'état de combinaison alcaline ou phosphatique, mais en combinaison organique sous forme d'uréide complexe. Le dédoublement de cette uréide donnerait, en présence de l'hyposulfite cuivreux, deux équivalents d'acide urique précipitable et un équivalent de substance solubilisante.

Nous nous proposons d'examiner plus tard, à l'aide d'expériences plus précises, cette conception nouvelle de l'état de l'acide urique dans l'urine, bornant le présent travail à l'étude complète d'un procédé pratique pour le dosage de l'acide urique.

Le fait nettement établi qui ressort de tout ce qui précède est que pour tout dosage dans l'urine, c'est un tiers en trop de réactif cuprique que l'on est obligé d'employer avant d'obtenir la précipitation complète.

Il suffit par suite, pour éviter toute correction de chiffres au moment du dosage et conserver tous les avantages d'une solution titrée à lecture directe, d'augmenter d'un tiers la proportion de sulfate de cuivre et de préparer les solutions suivantes :

DOSAGE DE L'ACIDE URIQUE URINAIRE PAR LA MÉTHODE DE DUCUNG

SOLUTION A.

Sulfate de cuivre cristallisé pur	4 gr. 47
Acide sulfurique	V gouttes
Eau distillée	Q. S.
pour 1.000 cm ³ .	

SOLUTION B.

Hyposulfite de soude.....	45 grammes
Sel de Seignette	45 grammes
Eau distillée	Q. S.
pour 1.000 cm ³ .	

Le mélange à volumes égaux de ces deux liqueurs précipite dans l'urine 1 mmgr. d'acide urique par cm³ et se conserve pendant 8 jours au moins.

Le manuel opératoire à suivre pour les dosages cliniques de l'acide urique ne diffère nullement de celui que nous avons indiqué pour les solutions aqueuses. Il suffit, avant de procéder au dosage, de débarras-

ser l'urine des phosphates alcalino-terreux en la traitant par un dixième de son volume d'une solution saturée de carbonate de soude, filtrer et doser ensuite sur 11 cm³ de filtratum, chaque dixième de cm³ de réactif cuprique employé correspondra à 1egr. d'acide urique par litre d'urine examinée.

L'on peut aussi plus commodément, dans la pratique, verser directement le réactif dans l'urine non débarrassée au préalable des phosphates alcalino-terreux ; pratiquement, on effectue le dosage sur 10 cm³ d'urine additionnée de 1 cm³ de solution saturée de carbonate de soude (1). Dans ce cas, le précipité obtenu n'est plus uniquement constitué par de l'urate de cuivre ; il contient en plus les phosphates et, par suite, est plus volumineux.

Les solutions alcalines pures se conservent plus longtemps que celles qui sont additionnées de carbonate de soude ; il y a tout avantage à utiliser la solution suivante comme réactif indicateur.

SOLUTION C.

Acide urique 0 gr. 10 environ
diluer dans 50 cm³ d'eau.

Ajouter :

Lessive de soude au dixième 2 cm³
puis compléter le volume à 100 cm³ environ.

La solution s'opère parfaitement. Il est le plus souvent inutile de la filtrer et elle se conserve pendant une dizaine de jours, alors que les solutions additionnées de carbonate de soude laissent déposer l'acide urique au bout de quarante-huit heures. »

1. Il est bon d'utiliser la remarque de C. PY, *J. de Pharm. et Chim.*, 1924 : « Pourquoi la méthode de DUCUNE était-elle tombée dans l'oubli... »

C'est que ceux qui ont voulu l'essayer l'ont trouvée inexacte. Ceci vient d'une mauvaise réduction du *modus operandi* : le « ajouter à l'urine le 1/10 de son volume d'une solution saturée de CO³Na² pour précipiter les phosphates » est la cause des erreurs constatées, car cette phrase contient 2 inexactitudes :

1^o 10 % de CO³Na² sat. ne précipite la totalité des phosphates de toutes les urines, ceci déjà signalé par VICARIO (VICARIO, Congrès de Chimie appliquée. Paris, 1897).

2^o Les phosphates seraient-ils précipités en totalité comme ils précipitent en liquide neutre ; on peut très bien ne pas obtenir dans ce cas un précipité pour les sels cuivreux, ou si on l'obtient, il serait dû aux composés puriques (sarcine X, mais non à l'acide urique).

Il faut, pour précipiter l'acide urique, un excès de solution carbonatée sodique et non seulement dans l'urine, mais dans les solutions aqueuses.

Si la solution ou l'urine ne contient pas cet excès de carbonate ou en contient trop peu, on n'obtient qu'une partie de l'acide urique total, c'est ce qui est arrivé à VICARIO et à nous-mêmes ; il faut, pour une précipitation complète et sûre, doubler la proportion de solution carbonatée sodique. »

Pour notre dosage optique dans l'urine, nous nous efforcerons évidemment de nous débarrasser des phosphates avant de précipiter l'acide urique.

DOSAGE DE L'ACIDE URIQUE SANGUIN

La connaissance des formes sous lesquelles l'acide urique existe dans le sang circulant est une notion indispensable à connaître dans l'établissement d'une méthode de dosage de l'uricémie.

Au début de l'étude de l'uricémie, on croyait avec GARROD que l'acide urique existait sous forme de sel seul et existait à la dose de 0 gr. 08 pour mille normalement.

Puis on a eu les travaux de KLEMPERER en 1895, MAGNUS LÉVY, FOLIN et DENIS en 1912, puis FOLIN et WU, BENÉDICT, ROGENT, GRIGAUT en 1921 (au point de vue quantitatif).

Actuellement, on estime la dose normale d'acide urique comprise entre 0 gr. 04 à 0 gr. 05 par litre pour le sérum ; 0 gr. 18 à 0 gr. 25 pour les hématies et 0 gr. 10 à 0 gr. 15 pour le sang total.

Désirant réaliser une précipitation de l'acide urique à l'état de sel insoluble, il convient de définir sous quelles formes existe l'acide urique dans le sang en vue de montrer ce qui sera insolubilité dans la réaction utilisée pour le dosage photométrique.

Des divers travaux relatifs à l'uricémie, il résulte que l'acide urique existe dans le sang humain sous 3 états :

- 1^o L'acide urique salifié,
- 2^o L'acide urique organique combiné,
- 3^o Les composés uricogènes.

1^o L'acide urique salifié ou acide urique libre existe dans le sang à l'état d'urate acide de soude, en solution vraie, ou encore en solution colloïdale favorisée et stabilisée par les albumines du sérum. Les méthodes préconisées par les Américains dosent cet urate seul, ainsi la méthode de FOLIN au lactate d'argent, et comportent des erreurs de défaut (faible).

Le taux normal de l'acide urique salifié est de 40 à 45 mgr. par litre pouvant atteindre 50 mgr. chez des sujets à alimentation surtout carnée, selon GUILLAUMIN. Le principe de son dosage, selon la méthode de FOLIN (cf. FOLIN et GUILLAUMIN) consiste à traiter le plasma désalbuminé par l'acide trichloracétique, ou

l'acide métaphosphorique ou par le lactate d'argent lactique, à centrifuger le précipité et à doser l'acide urique en présence, colorimétriquement. Ici, l'acide urique a été précipité sous forme de sel insoluble, l'urate d'argent.

2^o Acide urique organique combiné.

MATHIEU, P. WEIL et CH. OG. GUILLAUMIN (1) désignent ainsi :

« Des substances complexes, restes plus ou moins simplifiés des nucléotides originels auxquels reste appendue une molécule urique ou un corps qui, du moins, en donne certaines des réactions.

La proportion de cet acide urique combiné et sa nature font l'objet de travaux nombreux. STEIMTZ, le premier, a reconnu ces corps en proportions variables. BORSTEIN et GRIESBACH en trouvent 51 pour cent de l'acide urique dosable. MORRIS et MAC LEOD donnent une méthode de dosage de « l'acide urique en combinaison ».

On a publié quelques résultats sur les combinaisons uriques. DANÈS et BÉNÉDICT ont isolé du sang de bœuf un « complexe acide urique ».

BASS conclut après ses travaux que l'adénine peut exister dans le sang en combinaison avec l'acide muriatique ; GUDZENT a voulu voir les deux isomères de l'acide urique, leur forme soluble ou lactane et une forme insoluble ou lactine, ces formes étant en quantité variable dans la goutte et le sang des gouteux ; THANNHAUSER croit que l'oxydation de l'acide nucléique peut se faire en liaison avec une molécule de sucre du complexe nucléotide. Cette opinion est celle d'un grand nombre d'auteurs, le processus d'hydrolyse et d'oxydation des nucléines, qui transforme l'adénine et la guanine en hypoxanthine, xanthine, puis acide urique sont susceptibles de s'exercer à l'intérieur de la molécule organique. La base peut demeurer ainsi fixée à la molécule sucrée du composé nucléinique et parfois à la molécule phosphorée.

Pour doser cet acide urique, on dose d'abord l'acide urique, salifié par précipitation d'un sel insoluble (méthode du lactate d'argent), puis on dose l'acide urique dit total, par les méthodes colorimétriques ordinaires avec le réactif phosphotungstique de

1. P. WEIL et Ch. O. GUILLAUMIN, *L'ac. urique libre et l'ac. urique combiné des globules sanguins et du plasma* (C. R. Soc. de Biologie, 4 février 1922, p. 242).

FOLIN, sur le filtrat sanguin désalbuminé ; cette réaction donne un peu plus d'acide urique ; par différence ou à l'acide urique combiné.

Il va de soi que cette méthode colorimétrique où toutes les substances susceptibles de réagir sur le réactif phosphotungstrique se manifestent donnent un chiffre plus élevé en acide urique.

Nous-mêmes précipiterons l'acide urique sous forme de sel insoluble, l'urate cuivreux ; nos résultats devront donc cadrer avec ceux de FOLIN par la méthode de dosage sous forme d'urate d'argent. De plus, nous avons essayé de nous rapprocher des résultats dits « acide urique total », en utilisant le procédé de KHOURI (1) qui maintient le liquide biologique où l'on doit doser l'acide urique par précipitation, au bain-marie en présence d'acide. Il y a une hydrolyse certaine et le résultat trouvé est plus élevé et se rapproche plus du résultat acide urique total qu'avec la précipitation simple. Nous exposerons notre méthode d'opérer et nos résultats avec cette modification due à KHOURI (1).

3^e Pour terminer cet exposé, notons les composés uricogènes (2), substances complexes dérivées des acides nucléiques et qui sans être de l'acide libre ou salifié, sont productives d'acide urique. Il y a à côté de l'acide urique combiné d'autres substances qui, inaccessibles à toutes les réactions de l'acide urique fournissent de l'acide urique décelable et dosable après hydrolyse ménagée du plasma désalbuminé. Ces composés sont en minime partie dans le sérum et le plasma, de même pour l'acide urique combiné.

On admet actuellement que la teneur en acide urique salifié dans le sérum ou le plasma normal est de 35 mgr. par litre, chiffres donnés par FOLIN. C'est cette teneur que nous avons retrouvée en précipitant dans le sérum ou le plasma l'acide urique à l'état d'urate cuivreux ; ce sont les chiffres sur lesquels la clinique s'appuie pour tirer des conclusions et faire un diagnostic. La méthode colorimétrique donne une teneur un peu plus forte, 35 à 45 mgr. par litre chez les sujets normaux à alimentation mixte.

Pour la réalisation pratique d'un dosage, ces faits sont à signaler et leur connaissance suffit au clinicien. Au point de vue clinique et pratique, citons ici M. P. WEIL et GUILLAUMIN :

1. KHOURI (Ch). *Acide urique urinaire* (Bull. Soc. Chimie Biologie, 1924, t. IV, p. 476).

2. M. P. WEIL et Ch. O. GUILLAUMIN

« L'acide urique salifié constitue la majeure partie de l'acide urique plasmatique ; l'acide urique combiné organique n'y existe qu'à l'état de traces. Aussi, en pratique, peut-on se borner à la seule mesure dans le plasma, mais dans le plasma seulement de l'acide urique salifié. En effet, dans les globules, au contraire, ajoutent à juste titre les auteurs cités, la majeure partie de l'acide urique est à l'état combiné organique ; cependant, une quantité appréciable y existe à l'état salifié, imprégnant les globules. Son abondance y varie dans le même sens que dans le plasma. »

**Etude du rythme de précipitation de l'urate de soude
en solution aqueuse, par l'hyposulfite cuivreux ;
Construction de la courbe.**

A. — Les réactifs.

1^o Solution d'acide urique dans l'eau distillée à $pH. = 7$. Des solutions de concentrations progressives allant de 0 gr. 05 à 2 gr. 50 par litre ont été faites (lessive de soude q. s. pour dissolution).

2^o Liqueur pour la Précipitation.

Solution A :

Sulfate de cuivre cristallisé par. .	4 gr. 47
Acide sulfurique pur.....	V gouttes
Eau distillée q. s. p.	1.000 cm ³

Solution B :

Hyposulfite de soude	45 gr.
Sel de Seignette.....	45 gr.
Eau distillée q. s. p.	1.000 cm ³

1 cm³ du mélange précipite 1 mgr. d'acide urique dans l'urine.

3^o Solution de carbonate de soude à saturation dans l'eau distillée.

B. — Réaction.

Mesurer dans une éprouvette graduée de 50 cm³

Solution A.....	2 cm ³ 5
Solution B.....	2 cm ³ 5

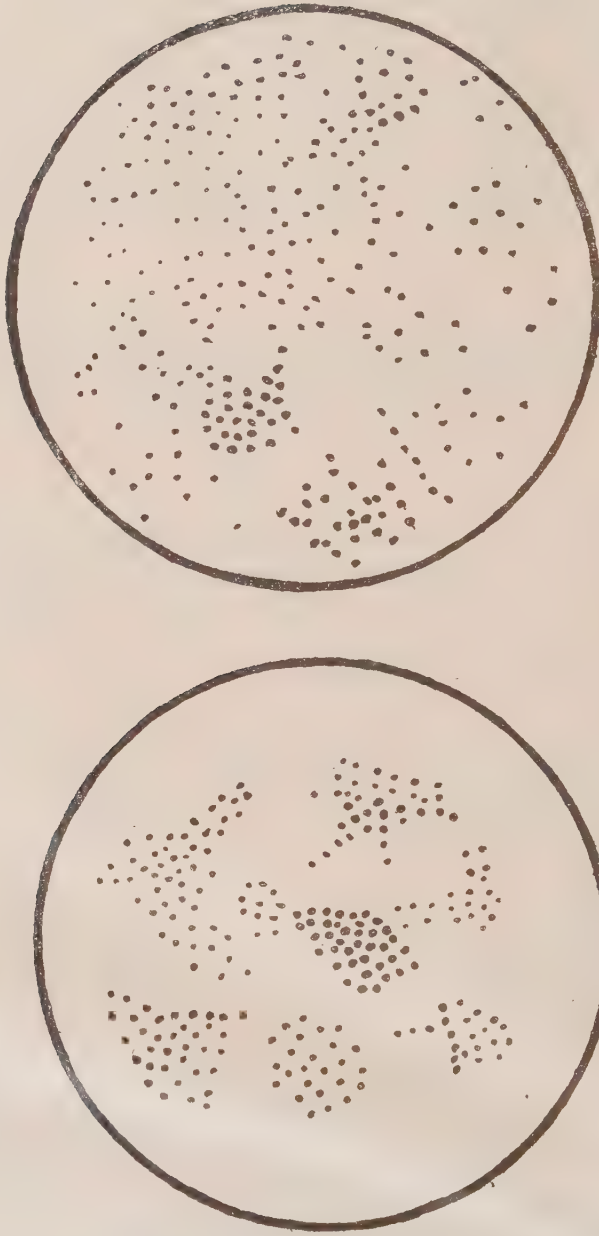


Fig. 24. — *Urate cuivreux.*

Fig. 25. — *Urate cuivreux, glycériné, oc. 3, obj. 6.*

Il a été difficile de faire bonnes photomicros de cet urate à cause de la faible différence entre les indices de réfraction du grain et du milieu intergranulaire.

Dans une deuxième éprouvette graduée de 30 cm³, mesurer avec une pipette à double trait 15 cmc. de solution d'acide urique contenant moins de 5 mgr. d'acide urique.

Ajouter ensuite :

Solution de Carbonate de soude . 2 cm³ 5

Verser ce deuxième mélange dans la première éprouvette et :

Eau distillée q. s. pour compléter à. 25 cm³ ou à 12 cm³ 5

Agiter et abandonner 1 minute.

Prélever 1 cm³ et mesurer la densité optique.

La densité optique vraie s'obtiendra en retranchant de cette première valeur la densité optique de la solution d'acide urique.

De cette façon ont été déterminés les points de la courbe correspondant aux différentes concentrations en acide urique.

L'état purement colloïdal du flocculum et sa parfaite stabilité rendent très faciles les dosages d'urates et d'acide urique par cette méthode. Il est mieux de compléter avec de la glycérine pure au volume de 25 cm³ ou 12 cm³ 5 qui assure la dispersion des grains (cf. fig. 24 et 25) et les stabilise.

I. DOSAGE DANS L'URINE.

La technique de la construction de la courbe s'applique sans modifications.

Il faut avoir soin préalablement de filtrer à *chaud* l'urine à analyser, de vérifier si elle est ou non albumineuse, de la diluer convenablement le cas échéant pour rentrer dans nos limites d'étalonnage en acide urique.

Dans le cas d'urine albumineuse, se reporter à la technique de dosage dans le sérum sanguin.

Dans l'urine sans albumine, précipiter les phosphates alcalino-terreux par addition préalable de carbonate de soude, chauffer 10 minutes au bain-marie, filtrer et faire la précipitation.

II. DOSAGE DANS LE SÉRUM SANGUIN.

Défécation :

Déféquer le sérum à l'acide trichloracétique à 25 pour cent

Sérum sanguin.....	15 cm ³
Acide trichloracétique à 25 pour cent	15 cm ³

Agiter, filtrer et prendre :

Filtrat q. s. pour en mesurer la densité optique.

Réaction :

Dans une éprouvette de 50 cm³ mesurer :

Solution A	2 cm ³ 5
Solution B	2 cm ³ 5

Dans une deuxième éprouvette préparer :

Filtrat	15 cm ³
Solution saturée de Carbonate de soude	2 cm ³ 5

Verser le contenu de la deuxième éprouvette dans la première, et ajouter :

Eau distillée (1) q. s. pour	25 cm ³
------------------------------------	--------------------

Agiter, attendre 1 minute et faire la détermination optique.

La densité optique vraie s'obtiendra en retranchant de cette valeur la densité optique précédemment mesurée.

Se reporter à la courbe pour l'obtention du chiffre de la concentration. Ce dernier sera naturellement multiplié par 2.

L'inconvénient de la méthode est évidemment de requérir un volume de sérum de 15 cm³. Pour y pallier, nous avons opéré en micro-analyse réduisant toutes les proportions au 1/10, ou au 1/2.

Défécation :

Sérum.....	1 cm ³ 5
Acide trichloracétique à 25 pour cent..	1 cm ³ 5

Agiter et centrifuger dans un tube à hémolyse.

1. Il est bon de compléter avec de la glycérine.

Reprendre :

Filtrat 1 cm³ 5

Ajouter :

Solution de Carbonate de soude ... 0 cm³ 25

Préparer dans une éprouvette de 5 cm³ bien graduée et vérifiée à la pipette à double trait :

Solution A..... 0 cm³ 25

Solution B..... 0 cm³ 25

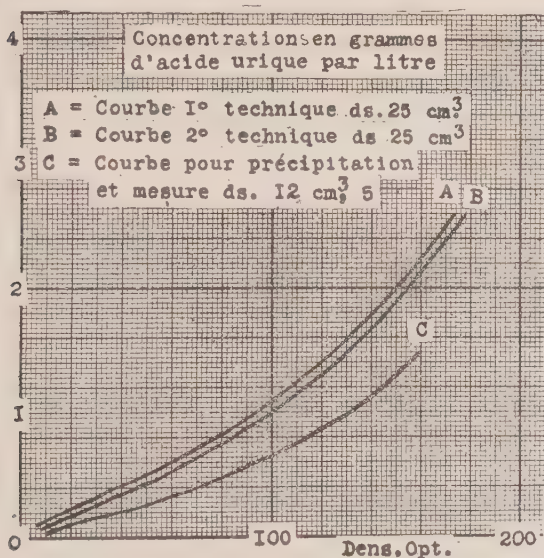


Fig. 26. — Courbe de dosage opacimétrique de l'acide urique à l'état d'urate cuivreux, au moyen du photomètre VERNES, BRICQ, YVON.

Verser ensuite le mélange filtrat, plus Carbonate de soude.

Compléter avec :

Eau distillée q. s. p. 2 cm³ 5

Déterminer la densité optique vraie et la concentration en acide urique correspondante comme précédemment.

Comme dans toute manipulation de microanalyse, il importe au plus haut point d'être très précis dans toutes les mesures, mais notamment dans celles effectuées avec les pipettes au 1/100^e.

CONCLUSION SUR LE DOSAGE DE L'ACIDE URIQUE.

Les courbes obtenues montrent que l'absorption de la lumière par le flocculum d'urate cuivreux est proportionnelle à la concentration du milieu en urate. Le dosage ainsi réalisé par opacimétrie est moins long et il est aussi précis que par volumétrie. L'élément dosé y est de l'acide urique seul.

TROISIÈME DOSAGE

DOSAGE DU PHOSPHORE DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES : URINE ET SANG

L'importance de la détermination du phosphore en biologie et en clinique apparaît toujours plus évidente. L'intérêt biologique du phosphore déjà démontré par tant de travaux a retrouvé récemment plus de force avec les derniers travaux sur les humeurs de MM. JAVILLIER (1), M. MACHEBŒUF (2), EMBDEN (3) BELL et DOISY (4), BORDEIANO (5), M. MOREL et ALAIN (6), MM. FLORENCE ENSELME et ESEN ZOLA (7).

La clinique qui dose le phosphore pour connaître la désintégration de la molécule organique phosphorée veut plus de précision et demande le dosage du phosphore « minéral », le dosage du phosphore « organique », tant de l'urine que du sang, question étudiée d'abord par RENALDS en 1846 (8), puis de nos jours par YOUNBURG et POCHER, par M. P. FLEURY et SUTU (9).

1. JAVILLIER, *Bull. Soc. Ch. Biol.*, 1928, 10, 342.
2. MACHEBŒUF, *Bull. Soc. Ch. Biol.*, 1926, 8, 464.
3. EMBDEN, Abt. I, Teil, Heft 5.
4. BELL et DOISY, *Journ. of Biol. Chem.*, 1920, 55.
5. C. V. BORDEIANO, *Ann. Soc. De Jassy*, 1926, 14, 353.
6. MOREL et ALAIN, *C. R. Soc. Biol.*, 1928, 1345.
7. FLORENCE Enselme et TSEN Zola, *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, 675.
8. RENALDS, *Philosophical transactions*, 1846, p. 463.
9. FLEURY et SUTU, *Journ. de Pharm. et Chim.*, 1926, p. 291.

Dosage du phosphore par précipitation et opacimétrie

Les composés insolubles du phosphore de préparation bien définie, susceptibles d'être utilisés pour un dosage opacimètre sont peu nombreux, ce sont :

1° Le phosphate ammoniacomagnésien dont la préparation est connue et très employée.

2° Le phosphate de magnésie.

3° Les sels insolubles de la combinaison phosphomolybdique.

La préparation des deux premiers corps ne se prête pas à un microdosage, de plus ils demandent une précipitation lente, et le premier corps est cristallisé en éléments assez gros.

L'application analytique des sels insolubles d'alcaloïdes de l'acide phosphomolybdique a été préconisée par MM. POUGET et CHOUGHACK. Voici ce qu'ils en écrivaient :

« Lorsqu'on ajoute à une solution très diluée d'acide phosphorique (contenant seulement quelques dixièmes de milligrammes de P^{20}_5 par litre) une solution de molybdate de soude, de l'acide azotique, puis quelques centimètres cubes d'une solution étendue d'un alcaloïde, il ne tarde pas à se former un trouble dû à la précipitation du phosphomolybdate de l'alcaloïde.

La couleur, l'intensité du trouble dépendent de l'alcaloïde employé ; l'intensité dépend aussi des proportions des divers éléments : alcaloïde, molybdate, acide azotique, acide phosphorique. On conçoit qu'en comparant au colorimètre la teinte développée dans un liquide contenant une quantité inconnue d'acide phosphorique à celle d'une solution type, on puisse déduire la quantité de P^{20}_5 contenue dans le liquide à examiner.

Cette réaction permet de déceler la présence de très petites quantités d'acide phosphorique : une solution contenant seulement 0 mmgr. 005 dans 100 cm³ prend après 5 à 10 minutes une teinte opaline qui se développe lentement, mais qui est très nette après 20-25 minutes ; la sensibilité est de $\frac{5}{100.000.000} = \frac{1}{20.000.000}$, bien supérieure à celle du réactif de NESSLER qui n'est que de $\frac{1}{10.000.000}$ (1). »

1. Cf. CAVALIER et NITHERS, *Bull. Soc. Chim.*, 1895, p. 309

La facilité d'exécution du dosage et la sensibilité du Réactif ont fait appliquer la méthode aux microdosages et surtout aux microdosages cliniques par BANG, et GREENWOLD surtout qui a réalisé un microdosage néphélométrique des phosphates du sang, en se servant du colorimètre commun ; c'est sa méthode qui sert de base à la nôtre. Les biologistes américains avec P. A. KOBER ont aussi une technique (1) sur le même principe, avec le colorimètre classique comme appareil de mesure. Mais c'est surtout M. KLEIMANN (2) qui, avec une grande pratique de la mesure opacimétrique, en a eu le meilleur résultat, en utilisant l'appareil de sa construction.

Il a pu déterminer 0.0005 mgr. P_2O_5 dans 25 cm³ de liquide ; il a décrit (3) son appareil qui est un opacimètre diffusimètre (4) et fait imprimer un fascicule à son sujet et sur ses usages (5). Cependant, nous avons vu (6) que l'idée de KLEIMANN assimilant l'opacimétrie à la colorimétrie et écrivant pour l'opacimétrie

$$\frac{H}{H'} = \frac{C}{C'}$$

(H et H' étant les hauteurs et C et C' les concentrations) est sujette à critique, car la condition d'application d'un tel principe repose sur l'égalité absolue des grains en présence tant dans le liquide à doser que dans le témoin. Les travaux des allemands BING et HECKSCHER et CUMAS BLIN (7) sur le dosage des lipoides phosphorés sont aussi à noter pour les critiques opératoires qu'ils ont suscitées.

La technique de Greenwold que nous avons adoptée tient compte des causes d'erreur signalées par les divers auteurs, elle est spécialement étudiée pour les divers dosages du phosphore du sang et des humeurs.

Nous exposerons d'abord cette technique.

1. P. A. KOBER, *J. of Chim.*, 13, 485, 1912-1913 ; voir aussi TAYLOR, *J. of Biol. Chem.*, 18, 1914.

2. H. KLEIMANN, *Ueber die Bestimmung der Phosphosäure*, *Bioll. Beitsch.*, 99, 1919.

3. *Kolloids Zeitschrift*, XXVII, 1920.

4. Maison FRANTZ SCHMIDT et HAENSCH, Berlin, S. 42. Prinzessinnenst, 16.

5. Urber ein neues Nephelometer und Lee Orinzipien nephelometrischen Messungen. *Souder Abdruck aus der Kolloid Zeitschrift*, 1920.

6. Chap. I.

7. *Bioch. Zeitsch.*, 1926.

D'après les recherches de GREENWALD, on arrive à précipiter complètement les graisses et les albuminoïdes du sérum avec l'acide picrique et à employer ensuite le filtrat obtenu pour doser les substances organiques.

La calcination de ce filtrat est beaucoup plus rapide que la calcination du sérum.

Ce procédé, dans ces conditions, est particulièrement propre à la détermination du phosphore du sang.

Principe. — Le microdosage du phosphore dans le sérum sanguin comporte d'un côté le dosage du phosphore organique et de l'autre côté, celui qui appartient aux lipoides phosphorés.

Cette séparation s'opère en précipitant le sang par une solution d'acide picrique acétique (ESBACH) dans lequel le phosphore organique est soluble, alors que des lipoides phosphorés vont dans le précipité.

Après séparation, les deux fractions sont calcinées et à l'aide d'un réactif molybdique strychnine, on obtient un trouble que l'on compare (au colorimètre ou au néphélémètre) avec le trouble d'une quantité connue de phosphore précipitée de la même façon.

Réactifs :

1^o Réactif acético-picrique :

Acide acétique	1 gr.
Eau distillée	99 —
Acide picrique	1 gr.

2^o Acide sulfurique concentré.

3^o Acide picrique concentré.

4^o Acide nitrique étendu :

Acide nitrique pur	1 partie
Eau distillée	2 parties

5^o Réactif de KLEINMANN :

1^{re} solution :

Acide molybdique pur (MO^3) (sans ammoniacque)	30 gr. 40
Carbonate de soude anhydre	9 gr. 6
Eau distillée bouillie longuement environ..	200 cm^3

On agite jusqu'à dissolution de l'acide molybdique, à l'exception de quelques flocons d'impuretés. On filtre et on ajoute à la solution encore chaude 160 cm³ d'HCL concentré (Densité 1.19).

On laisse refroidir. On aura préparé, d'autre part, une solution avec :

2^e solution :

Sulfate de strychnine pur.....	1 gr. 60
Eau distillée chaude à 90° environ.....	100 cm ³

On mélange les deux solutions ; après refroidissement, on complète à 1.000 cm³ et on conserve dans des bouteilles sombres.

6^o Solution étalon de phosphate :

Po ⁴ Na ² H 12 H ² O	0,302 mgr. 90
Eau distillée	1.000 cm ³

Pour l'usage, on étend au 1/10^e cette solution de phosphate.

Elle contient, par conséquent, pour 5 cm³, 0 mgr. 03 de P²O⁵.

Technique. — En s'appuyant sur le principe de GREENWALD, 1 cm³ de sérum qui doit être entièrement déshémoglobinisé est mélangé dans un tube à centrifuger avec 8 cm³ de solution picrique.

On ajoute 1 cm³ d'eau et on mélange bien avec un agitateur. On centrifuge fortement. On décante entièrement le liquide clair qui contient le Phosphore *anorganique*. Ce liquide, placé dans un verre d'Iéna, est évaporé jusqu'au volume d'environ 1 cm³. Après refroidissement, on ajoute 1 cm³ de SO⁴H² concentré et on chauffe de nouveau jusqu'à ce que tout l'acide picrique soit éloigné. Pour finir, on ajoute quelques gouttes d'acide nitrique concentré et on chauffe de nouveau (presque à sec). L'acide picrique doit être complètement éloigné, ainsi que les traces qui pourraient rester adhérentes aux parois du verre, parce que au cours des opérations ultérieures, il pourrait se faire des sels explosibles. A cet effet, il est nécessaire de chauffer les parois du verre, ce qu'on obtient très facilement en plaçant le verre à chauffer dans un tuyau de tôle d'un peu plus grand diamètre et dans lequel le verre se trouve suspendu par ses bords évasés.

Après avoir terminé la manipulation, on transvasera le contenu du verre, en rinçant plusieurs fois avec de l'eau distillée, dans un ballon chargé de 50 cm³. On neutralise avec de la lessive de soude

au 1/10^e et on complètera à 50 cm³. De ce mélange, on porte selon la quantité de phosphore (qu'on prévoit trouver) 10 cm³ à 20 cm³ dans un ballon de 50 cm³. On ajoute 5 cm³ de NO³H étendu. On ajoute assez d'eau pour que le volume atteigne 40 à 45 cm³ et on fait la précipitation.

Pour cela, on verse 2 cm³ du réactif de KLEINMANN, on remplit jusqu'à 50 cm³ avec de l'eau distillée, on agite et on laisse 20 minutes en contact.

Au bout de ce temps, on agite 5 ou 6 fois le petit ballon et on verse un peu du liquide opaque obtenu dans une petite cuve de l'appareil de Vernes, BRICQ, YVON ou dans la cuve d'un autre appareil et on mesure l'absorption.

Dans la méthode primitive de KLEINMANN et dans la méthode de GREENWALD, on fait une précipitation semblable avec la solution titrée de phosphate et on compare le trouble obtenu avec celui que l'on veut doser.

Nous avons précisément construit des courbes d'absorption avec les appareils que nous préconisons. Nous opérons de la façon suivante :

Technique de précipitation des phosphates.

Rythme de précipitation.

Dans une série de ballons de 50 cm³ on dispose des quantités croissantes de solution titrée de phosphate de soude contenant pour 5 cm³ des quantités de phosphate de soude allant de 0 mgr. 01 à 0 mgr. 05 et dans chaque ballon on ajoute 5 cm³ d'acide nitrique, 40 cm³ d'eau, 2 cm³ de réactif de KLEINMANN, on complète à 50 cm³ on laisse 20 minutes en contact et on mesure l'absorption. Avec les chiffres obtenus, on dresse la courbe.

Dans ces mesures, il est bon de retrancher de la densité optique ou chiffre d'absorption, le chiffre d'absorption obtenu avec un témoin constitué par 2 cm³ de réactif de KLEINMANN, 5 cm³ d'acide azotique et eau q. s. pour 50 cm³.

Dosage du phosphore organique.

(A opérer après le dosage du phosphore minéral.)

Dans le tube à centrifuger dont on a conservé le culot qui contient les lipoides phosphorés, on verse 2 cm³ d'acide sulfurique concentré.

On jette quelques morceaux de pierre ponce et on entreprend la calcination comme pour la précédente fraction.

Celle-ci se fait naturellement plus difficilement que la première.

Dans le verre incliné, on ajoute de temps en temps quelques gouttes d'acide sulfurique concentré et également quelques gouttes d'acide nitrique concentré jusqu'à ce que la décoloration du mélange indique que la calcination complète est effectuée.

On laisse ensuite refroidir et transporter le liquide comme il a été décrit pour la première fraction, dans un ballon de 50 cm³.

On neutralise et on emploie 10 à 20 cm³ de la solution complétée à 50 pour l'analyse.

On ajoute ici 5 cm³ d'acide nitrique étendu, de l'eau distillée jusqu'au volume de 40 à 45 et on met également le réactif de KLEIN-MANN.

On attend 20 minutes et on mesure l'absorption.

CONCLUSIONS SUR LE DOSAGE DU PHOSPHORE.

La courbe d'absorption du phosphomolybdate de strychnine représente une fonction linéaire entre l'opacité du précipité envisagé et la concentration en phosphore. Le dosage est assez rapide, mais c'est un microdosage qui nécessite une attention et une habitude formées à ce genre de dosage.

QUATRIÈME DOSAGE

DOSAGE DE L'ACÉTONE

L'acidose accompagnée ou non d'hyperglycémie est le plus souvent liée à l'apparition dans le sang, puis dans l'urine, de l'acétone et surtout des acides acétylacétiques et β -oxybutyriques. Le diagnostic positif de l'affection et un pronostic basé, fait que la détermination de ces corps est fréquemment demandée et doit être suivie chez un même malade.

Pour la détermination qualitative de ces corps, on possède des réactions nombreuses, il y a les réactions spécifiques de l'acétone

par l'acide salicylique, selon FROMER, par l'O. nitrobenzaldehyde, selon PENZOLDT, par la nitrophénylhydrazine, par le réactif de NESSLER selon MM. BOUGAULT et GROS ; il y a aussi les réactions du Bloc acétone + acide acétylacétique ; pour l'acide β -oxybutyrique, il n'y en a pas : la déviation lévogyre n'est pas spécifique.

La détermination quantitative de ces corps se ramène, d'une part, au dosage du bloc acétone + acide acétylacétique, de l'autre à celui de l'acide β -oxybutyrique : l'un et l'autre se ramènent à un dosage d'acétone, étant donné que le 1^{er} acide perd totalement son groupe CO^2 au cours de la distillation du liquide et que, pour le second, les seuls modes de dosage pratiquement en usage utilisent la formation d'acétone par oxydation de l'acide β -oxybutyrique en milieu sulfochromique.

Comment donc insolubiliser l'acétone pour en réaliser un dosage optique ?

MÉTHODES DE PRÉCIPITATION DE L'ACÉTONE A L'ÉTAT DE COMBINAISON INSOLUBLE.

Choix d'une méthode pour dosage optique. L'acétone ou propanone donne avec les solutions aqueuses de sels mercuriques, un certain nombre de combinaisons particulièrement insolubles. Elles s'obtiennent en additionnant une solution aqueuse d'acétone d'une des solutions suivantes :

1^o Solution alcaline de chloroiodo-mercurate de potasse à froid, selon MM. BOUGAULT et GROS (1).

2^o Solution acide de sulfate de mercure, selon M. DENIGÈS (2) à chaud.

3^o Solution alcaline de cyanure de mercure selon MARSH et STRUTHERS (3) et selon SCOTT-WILSON (4).

4^o Solution de potasse étendue et d'iodure mercurique (5).

Signalons, enfin, qu'on a cherché à précipiter l'acétone pour la doser sous forme d'iodoforme, c'est la méthode néphélométrique de ISSOGLIO (6). Nous lui objecterons au point de vue analytique

1. MM. BOUGAULT et GROS, *J. de Pharm. et Chim.*, juillet 1922.
2. DENIGÈS, *Chimie analytique (Traité)*.
3. MARSH et STRUTHERS, *Chem. Society*, t. XXIV.
4. SCOTT-WILSON, *J. of Biol. Chem. Soc.*, 1913.
5. M. E. MONTIGNIE, *Bull. Soc. Chim.*, 4^e série, t. 43, p. 1115, 1928.
6. *Giorn. Farm. Chemic.*, XVI, p. 301, 1917 et d'après *Ch. Abstract* (11), CXVI.

qu'elle est peu sensible, insuffisamment quantitative et présente des causes d'erreur dues au réactif (1). Au point de vue optique, les cristaux sont assez volumineux, de pourtour irrégulier, ne permettant pas d'opérer un dosage optique dans de bonnes conditions et de régler facilement un rythme de précipitation.

1^o La recherche du réactif la plus sensible et du grain le plus fin nous ont amené à examiner les grains du précipité des 4 précédents réactifs.

On constate que le grain du précipité obtenu avec le réactif de

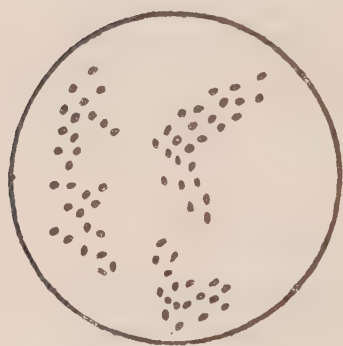


Fig. 27. — Précipité par le R. de DENIGÈS.

Dessiné
à la chambre
claire

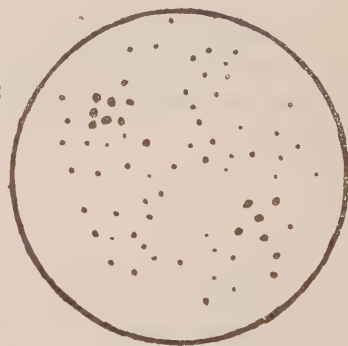


Fig. 28. — Précipité par le R. de NESSLER.

NESSLER est un peu plus fin que la combinaison de DENIGÈS ; il est aussi plus facile à disperser et il est un peu plus léger (fig. 28 et 29).

Le grain obtenu avec le réactif de SCOTT-WILSON est d'une bonne finesse, mais nous avons abandonné ce réactif pour des raisons d'ordre chimique tenant à sa sensibilité, à sa spécificité et à sa préparation et conservation.

Les travaux de MM. BOUGAULT et GROS ont montré la sensibilité extrême du réactif au chloriodermocurate de potasse, il suffit de rappeler le tableau suivant de la thèse de M. GROS.

1. MM. BOUGAULT et GROS, *Journ. de Pharm. et Chim.*, p. 304, 1919, 26, p. 170 et GROS, thèse, p. 25.

QUANTITÉ D'ACÉTONE DANS 10 CM³ (en mgrs.).

Réactifs	10 mgr.	5	2	1	0,5	0,1	0,01
R. de Denigès.	Pr. très net	net	net	net	louche	limite	7
R. de Nessler..	Pr.	très	abondant		très net	net	louche très net

Il est également plus sensible que le réactif de SCOTT-WILSON dont voici la formule à titre documentaire et telle que nous l'avons utilisée pour nos essais :

A. Solution alcaline de cyanure de mercure :

Cyanure de mercure	10 gr.
Eau.....	600 cm ³
Soude en plaques	180 gr.
Eau.....	600 cm ³

B. Solution de Nitrate d'argent.

Nitrate d'argent crist.	2 gr. 9
Eau.....	400 cm ³

2° Et ce qui va de soi, ainsi que nous l'avons déjà écrit, le réactif précipitant le plus sensible donne le grain précipité le plus fin. Ce qui permet un dosage optique à des concentrations infiniment faibles.

3° Une suspension de grains fins reste toujours plus longtemps stable qu'une autre de grains plus gros.

4° Enfin le précipité obtenu par la technique de MM. BOUGAULT et GROS est amorphe, état physique le meilleur pour les dosages optiques par absorption (1).

1. Consulter à ce sujet l'historique de la réaction dans la thèse de M. GROS, ainsi que G. GILLET, *Bull. Soc. ch. Belge*, t. XIII et MARSH et STRUTHERS, *Ch. Soc. Proc.*, t. XXIV et Emile PITRALLI, *Arch. Farm.*

**Précipitation de l'acétone par le réactif
de MM. Bougault et Gros d'une solution aqueuse titrée d'acétone.
Etude du rythme de précipitation.**

Réactifs nécessaires. Nous avons préparé les solutions suivantes :

1^o Solution aqueuse d'acétone à 1/1.000^e. Nous avons utilisé de l'acétone pure régénérée de sa combinaison bisulfite et pesé soigneusement dans une ampoule, brisée ensuite dans le flacon d'eau destiné à la solution étalon.

2^o Réactifs.

Solution A :

Bichlorure de mercure	13 gr. 55
Iodure de potassium.....	36 gr.
Eau q. s. p.	500 cm ³

Solution B :

Hydroxyde de sodium	270 gr.
Eau q. s. p.	1.000 cm ³

3^o Divers liquides de viscosités fortes.

ESSAIS ET OBSERVATIONS.

Proportions. — Les proportions adoptées sont celles de MM. BOUGAULT et GROS, avec un grand excès de réactif précipitant vis-à-vis de l'acétone, pour obtenir une précipitation totale. A des quantités croissantes d'acétone, depuis 0 mgr. 01 à 0 mgr. 25 disposés dans des tubes à essais gradués, ou dans des éprouvettes de 15 cm³ nous avons ajouté 4 cm³ 375 du réactif préparé, en ajoutant 8 cm³ de la solution B à 19 cm³ de la solution A et H²O, de façon à obtenir 11 cm³ de liquide.

Rythme de précipitation. — A. Influence de la concentration en acétone. — On se rend facilement compte à l'œil et au photomètre que l'opalescence des faibles concentrations se précise lentement.

B. Influence du temps. — La précipitation est complète au bout de 10 à 20 minutes. Au début, vitesse peu forte qui s'accroît avec le temps de réaction. Le précipité sédimenté assez vite et avant que la précipitation soit totale.

C. Influence de la température. — Si on plonge au bain-marie un tube en réaction, on se rend compte que le précipité se forme vite et sédimente vite.

Comme, d'autre part, nous avons remarqué qu'il y a sédimentation avant que la réaction de précipitation ne soit totalement finie, nous avons fait des séries de réactions à une température moyenne, à 40° et nous avons observé :

1° Que la réaction est plus rapide et totale au bout de 5 minutes pour les concentrations envisagées.

2° Qu'il y a floculation et sédimentation rapides.

3° Que, à chaud, à 40°, la réaction est complète en 10 minutes.

Préparation d'une suspension stable :

Les observations précédentes montrent qu'il serait impossible de faire une bonne mesure opacimétrique sur les préparations telles qu'elles sont mises en réactions, à cause de la rapidité de sédimentation et à cause de l'importance ici des variables, concentrations, temps, température.

De là, les 2 séries d'essais suivants :

1° Nous avons pensé donner de la viscosité en ajoutant dans le milieu des éléments visqueux, sirop de saccharose ou glycérine. Mais les saccharoses en présence du milieu fortement alcalin réduiraient le réactif de NESSLER, réaction se manifestant par un brunissement du milieu à doser.

Avec la glycérine, nous avons fait une observation plus intéressante au point de vue général. Ayant mis en observation des séries de tubes à diverses concentrations en acétone et contenant de la glycérine, nous avons observé qu'à froid, au bout de 10 à 15 jours les milieux laissent déposer des cristaux argentés. Nous avons pensé qu'ils étaient des combinaisons de la glycérine et du mercure de réactif, et, en effet, nous avons séparé par cristallisations fractionnées à froid, puis à chaud, des combinaisons du mercure et des produits d'oxydation et de dégradations de la glycérine.

2° Désirant doser un précipité dans un milieu physiquement et chimiquement défini, nous avons séparé par centrifugation le précipité (combinaison définie) du milieu de réaction, ensuite nous l'avons mis en suspension dans un milieu connu.

Le précipité se centrifuge bien, lavé à l'eau, il ne réagit pas sur la glycérine et se remet bien en suspension ; si on le lave avec une

solution de chlorure ou de sulfate de soude, il reprend moins bien l'état de fine suspension.

Comme nous le recommandons expressément, il est bon de faire un rapide examen microscopique de la suspension, entre lame et lamelle pour vérifier qu'elle est dans un état satisfaisant pour le dosage, c'est-à-dire avec des grains également répartis et non assemblés en grumeaux plus ou moins gros.

**Technique de précipitation de l'acétone
à partir d'une solution aqueuse d'acétone.
Mise en suspension du précipité, dosage optique.**

Nous avons dosé le précipité au moyen de l'appareil de VERNES-YVON et du spectrocolumètre de MM. BAUDOUIN et BÉNARD. Pour obtenir des opacités susceptibles d'être mesurées par ces appareils, nous avons précipité des doses d'acétone allant de 0 mgr. 02 à 0 mgr. 25 pour mesure au photomètre de VERNES et de 0 mgr. 02 à 0 mgr. 12 pour l'appareil de MM. BAUDOUIN et BÉNARD.

Technique. — Dans un tube à essai contenant l'acétone sous un volume de 4 cm³ 5, on verse 11 cm³ du réactif concentré. On agite et on plonge le tube pendant 5 minutes dans un bain-marie à 40°, on le retire et on le refroidit sous un courant d'eau, puis on centrifuge ; le liquide surnageant est décanté et le précipité lavé avec 10 cm³ d'eau, on malaxe avec un gros agitateur en verre, puis on agite doucement.

On centrifuge à nouveau, on décante l'eau et on ajoute quantité suffisante de glycérine à 30° B., pour faire 6 cm³ environ, on malaxe avec un gros agitateur, on agite fortement, on complète à 11 cm³ avec de la glycérine. La suspension ainsi préparée tient plusieurs jours pour nos faibles concentrations, plusieurs heures pour les fortes. La suspension est mise aux appareils. Utilisant deux appareils, nous exposerons les résultats et mesures.

DOSAGE AU PHOTOMÈTRE VERNÈS, BRICQ, YVON.

Courbe d'absorption. — Après vérification microscopique des milieux, nous avons :

1° Observer que les milieux étaient et permettaient de faire tranquillement les lectures, après avoir pris soin d'agiter fortement.

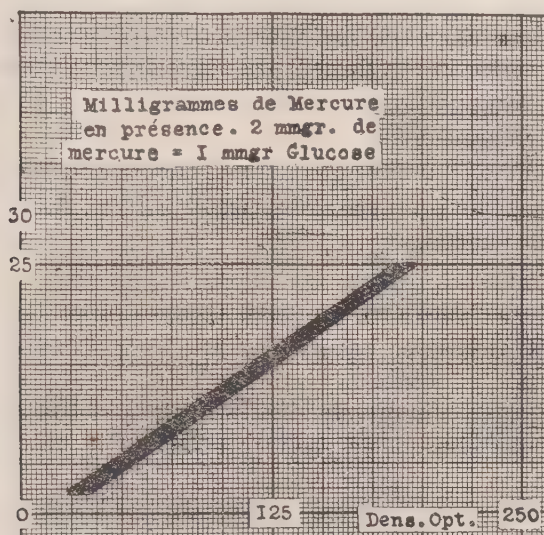


Fig. 29 — Dosage par le photomètre VERNES, BRICQ, YVON.

2° Pour 5 séries d'expériences faites soigneusement, nous avons obtenu les chiffres suivants :

Concentration en milligr. d'acétone en présence	Densité optique				
	1re mesure	2e	3e	4e	5e
0,20	200 à 205	210	220	210	210
0,18	190	185	200	185	180
0,16	160	165	160	155	160
0,14	150	140	150	155	150
0,12	130	125	130	130	130
0,10	110	110	110	120	
0,08	90	100	90	90	
0,06	70	65	70	75	70
0,04	50	50	50		
0,02	30	25	30		

Comme dans tout dosage, l'erreur de lecture (ici égalité de 2 pla-

ges lumineuses moyennes) s'ajoute à l'erreur de manipulation. La courbe obtenue avec ces chiffres est une parabole très voisine d'une droite. Les erreurs maxima sont de 8-10 %. Nous avons représenté graphiquement ces erreurs en traçant une surface dans laquelle se trouvent tous les points lus. Cela permet de se rendre compte pour chaque mesure et rapidement, du degré de précision de dosage.

Toutes les manipulations doivent être faites avec grand soin et du matériel irréprochable.

La courbe obtenue montre que l'absorption est fonction continue de l'opalescence du précipité, elle vérifie les lois de l'absorption précédemment énoncées.

DOSAGE A L'APPAREIL DE MM. BAUDOUIN et BÉNARD
FONCTIONNANT COMME SPECTRO-OPACIMÈTRE.

Le petit appareil clinique de MM. BAUDOUIN et BÉNARD possède un dispositif permettant de monochromatiser le pinceau de lu-

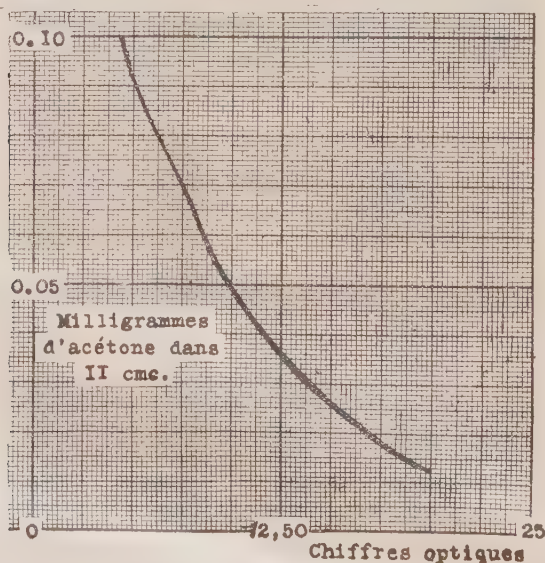


Fig. 30. — Courbe du dosage opacimétrique de l'acétone, au moyen de l'appareil de MM. BAUDOUIN et BÉNARD.

mière passant à travers un milieu trouble à doser et à travers un milieu trouble étalon ; il cadre donc avec les lois optiques de

l'absorption précédemment énoncées. Comme il nécessite un milieu étalon (1), ce qui est le point délicat, et ce qui au point de vue pratique demande une manipulation supplémentaire, nous avons cherché un milieu standart ; après avoir essayé l'encre de Chine, comme d'ailleurs M. le Professeur BÉNARD nous l'a aussi indiqué, puis des écrans WRATTEN et CHANCEL ; nous avons arrêté notre choix sur l'écran CHANCEL (2) absorbant $1/10^e$ de chacune des radiations du spectre.

Au cours des expériences que j'ai faites j'ai donc étalonné l'appareil par rapport à cet écran pour plusieurs précipités en suspension.

L'expérience a montré :

1° Que la zone où l'on peut faire de bonnes mesures est assez réduite, beaucoup plus qu'avec le photomètre VERNES, BRICQ, YVON.

2° Qu'autour du point où l'extinction du spectre paraît nette, il y a une frange demi-lumineuse, d'où erreur de lecture pour certains manipulateurs.

3° Pour 5 séries d'expériences, les chiffres suivants ont été obtenus avec les concentrations indiquées et la même préparation des suspensions.

Milligr. d'acétone en présence	Densité optique				
	3	3	4	4	4,5
0,12	3	3			
0,10	4,5	4,5	4	4	4,5
0,05	8	8		7,5	8
0,03	11	11,1		12	10,5
0,02	13,5				

Les mesures sont mauvaises en dessus ou en dessous de ces chiffres.

J'ai remarqué qu'il est préférable de ne pas envoyer le verre dépoli diffuseur, les mesures sont moins bonnes. La courbe obtenue se situe sous la précédente.

1. Voir ce que nous avons écrit.

2. Chez PELLIN.

APPLICATIONS AUX MILIEUX BIOLOGIQUES.

Le problème est toujours le même : il faut extraire le corps à doser, l'acétone, du milieu où il se trouve, par un procédé physique ou chimique, afin d'en faire une solution et d'appliquer la technique et mise au point. Nous l'extrairons par distillation et purification.

La pratique courante demande le plus souvent le dosage de l'acétone dans l'urine, c'est le seul que nous envisagerons.

DOSAGE DE L'ACÉTONE DANS L'URINE.

Extraction de l'acétone. — On sait que l'urine contient de l'acétone, et de l'acide acétylacétique qui, par chauffage, perd CO^2 et donne de l'acétone, elle contient aussi de l'acide β -oxybutyrique qui, par oxydation, donne de l'acétone. Nous avons tiré les techniques préconisées ici des travaux de M. VIDMARCK sur les microdosages de M. GROS (1) et de Ch. O GUILLAUMIN (2), de P. FLEURY YACOUTBOUALÉ (3).

Acétone préformée seule.

Extraction. — 1° Le meilleur procédé est celui par absorption de l'acétone dans le vide. Citons la technique et les remarques de M. GROS.

« L'urine à essayer est préalablement acidulée par l'acide phosphorique.

Pour éviter les pertes possibles d'acétone, l'acidulation est effectuée dans un ballon muni d'un bouchon percé de deux trous. Par l'un passe un entonnoir muni d'un robinet, l'autre est traversé d'un tube de sûreté.

L'acide est introduit par petites portions, en refroidissant chaque fois sous l'eau courante ; un petit morceau de papier bleu de tournesol sert d'indicateur.

Après virage au rouge, on ajoute encore un excès d'acide, puis on transvase rapidement l'urine dans le système à absorption déjà décrit et hermétiquement clos.

1. Thèse de Pharmacie. Paris.

2. *J. de Pharm. et Chimie*, 1923.

3. *J. de Pharm. et Chimie*, t. 3, p. 406.

On place l'appareil à l'étuve à 40°.

A défaut d'un dessiccateur, nous signalons un dispositif très facile à réaliser et qui donnera d'excellents résultats.

Sur un flacon à très large ouverture de 500 cm³ de capacité, on ajuste parfaitement un bon bouchon en liège.

On fixe au centre du bouchon une spirale de fil de fer destinée à supporter un petit cristallisoir en verre de 3 à 4 cm³ de diamètre (Fig. 1).

On introduit l'urine acidifiée dans le flacon, on verse du réactif dans le petit cristallisoir, on bouche hermétiquement et on porte à l'étuve à 40°.

Résultats. — Nous avons effectué ainsi de nombreux essais sous pression normale et sous pression réduite, et portant sur des volumes d'urine variant entre 200 et 300 cm³.

Les essais sous pression réduite ont été effectués dans un dessiccateur à vide, auquel on avait adapté, sur le trajet du caoutchouc conduisant à la trompe, un barboteur témoin contenant du réactif de NESSLER.

Nous avons contrôlé tous ces essais en introduisant dans des volumes d'urine identiques des quantités mesurées d'acétone.

La quantité de précipité formée dans le réactif était chaque fois en rapport avec celle d'acétone introduite.

Parfois, nous avons rencontré des urines contenant des composés réducteurs volatils qui auraient pu gêner la sensibilité de la réaction. Dans ces cas, il suffisait d'aciduler le réactif où s'était formé le précipité, avec de l'acide chlorhydrique dilué et en refroidissant sous l'eau courante. Dans le filtrat, ainsi débarrassé des sels de mercure réduits, la réalcalinisation provoquait à nouveau la formation du composé acétonique.

Une échelle de précipité nous a permis, par comparaison, de faire de la sorte des dosages suffisamment précis. »

Citons, pour mémoire la technique de M. P. FLEURY :

« Pour arriver à un résultat pratiquement quantitatif, dans un temps relativement court, il est nécessaire de réunir deux conditions :

1° Mettre le réactif et l'urine en contact avec l'atmosphère par une grande surface.

2° Opérer dans le vide qui favorise l'évaporation technique.

Sous une cloche à vide munie d'un entonnoir à brome et reliée à une trompe à vide, placer l'un au-dessous de l'autre 2 cristallisoirs plats de 15 cm³ de diamètre (boîtes de petri) ; dans le cristallisoir inférieur mettre 20 cm³ de R. de NESSLER, placer la cloche, faire le vide et introduire à l'aide de tube à brome l'urine dans le cristallisoir supérieur ; rincer le tube à brome avec 99 cm³ d'eau qu'on fait passer dans le cristallisoir.

Au bout de 5 heures en été ou d'une nuit en hiver, l'absorption est terminée. »

2° Le procédé par distillation, d'après ENGFELDT, est plus long et délicat. On opère sur un échantillon d'urine récemment émise et sans défécation préalable. Dans le ballon de l'appareil, on mesure 200 cm³ de permanganate de potasse à 2,5 p. 100 et 1 cm³ d'acide acétique ; on ajoute 10 cm³ d'urine et un peu de talc ; on monte l'appareil et on distille pendant 20 minutes en recueillant le distillat dans 20 à 300 cm³ d'eau ; on replace le distillat dans le ballon ; on ajoute la quantité suffisante d'eau pour 100 cm³, puis 20 cm³ de soude à 10 p. 100 et 10 cm³ d'eau oxygénée à 10-12 volumes ; on redistille doucement au début, puis pendant 10 minutes à vive ébullition, en recueillant dans l'eau ; on opère ensuite le titrage par iodométrie. Il doit le plus souvent être fait usage des solutions d'iode et d'hyposulfite N/100 et même N/1.000.

Les précipités obtenus et épurés suivant toutes les recommandations précédentes sont mis en suspension dans 11 cm³ de glycérine à 30 B^e et doser. On se reporte à la courbe.

DÉTERMINATIONS QUANTITATIVES
DE L'ACÉTONE + ACIDE ACÉTYLACÉTIQUE DANS L'URINE
PAR DISTILLATION ET PURIFICATION.

(Appareils et détails opératoires.)

A. — Appareils (1).

« L'appareil m'ayant rendu les meilleurs services dans les diverses distillations acétoniques est constitué par un vase d'ERLENMEYER, ou un ballon de 500 cm³ surmonté d'un appareil rectificateur constitué par une colonne en verre à pointes, de VIGREUX, à 8 ou 9 plateaux disposés sur 20 à 25 cm. de haut ; la colonne débouche par un tube 2 fois coudé dans un réfrigérant cylindrique à renflements lenticulaires, placés verticalement. Quand on veut servir le distillat recueilli au dosage de l'acétone, on raccorde sur le réfrigérant un tube dont la boule de sûreté est prolongée par un tube de 7 à 10 mm. de diamètre, terminé par une petite boule à trous de VILLIERS ; la boule plonge alors dans 10 à 30 cm³

1. Cf. GUILLAUMIN, *J. de Pharm. et Chim.*, loc. cit.

d'eau distillée placés dans une éprouvette ou un flacon, qui sont protégés du feu par une plaque de bois ou de carton d'amiante.

B. — *Manipulations.*

1^o *Défécation.* — Dans un vase jaugé ou une éprouvette de 250 cm³, mesurés dans l'ordre : urine 25 cm³, eau 100 cm³, solution cuprique 50 cm³, mélanger, puis ajouter 50 cm³ de lait de chaux ; le mélange, fortement agité, doit alors prendre une teinte bleue plus foncée ; on complète à 250 cm³ avec de l'eau, on mélange, on laisse reposer 30 minutes et on verse sur un filtre plissé.

Remarques. — Le filtrat limpide doit être incolore et exempt de sucres, ceci est réalisé si la teneur en glucose est égale ou inférieure à 8 % ; on peut vérifier l'absence de ceux-ci par la liqueur de FEHLING, mais il est généralement suffisant de s'assurer sur quelques centimètres cubes de ce filtrant que la phénolphthaléine y prend une coloration rouge vif. Si le liquide restait incolore en présence de l'indicateur, à cause de la carbonatation partielle du lait de chaux, il faudrait recommencer la défécation en augmentant la proportion en chaux. Pour les rares urines contenant plus de 8 % de glucose, on abaisse la prise d'essai de l'urine à 20 ou 15 cm³. Il n'y a pas lieu de se préoccuper des pell cules qui peuvent altérer par la suite la limpidité du filtrat ; elles ne sont constituées que par du CO³ Ca, formé au contact de l'air.

2^o *Elimination de l'acétone, des corps perturbateurs volatils et dosage proprement dit.* — Mesurer dans le ballon : filtrat urinaire 25 cm³, ou un volume correspondant à 2,5 cm³ d'urine, eau distillée 140 cm³, acide sulfurique dilué 2 cm³ : placer la colonne et chauffer pour avoir une ébullition soutenue jusqu'à recueillir 40 cm³ de distillat ; retirer alors le ballon du feu et, sans attendre, verser 8 cm³ d'acide sulfurique, dilué, 35 cm³ de réactif mercurique et 5 cm³ de solution de bichromate ; placer de suite sous le réfrigérant ascendant et faire bouillir pendant 1 h. 30. On refroidit le ballon sous l'eau sans attendre davantage et on recueille le précipité séparé en gros flocons, sur un creuset de GOOCH, garni d'amiante et taré, en s'aidant de la trompe ; le ballon est rincé et le précipité lavé par environ 200 cm³ d'eau distillée froide, ajoutés par petites portions et versés sur le creuset ; on essuie la paroi externe de celui-ci et on la porte à l'étuve à 100-110° pendant 3 ou 4 heures, puis on pèse. Soit p , milligramme le résultat exprimé en grammes d'acide β -oxybutyrique par litre d'urine, tous calculs et corrections faits, sera $p \times 0,0473$.

A défaut de creuset, on pourrait prendre 2 filtres en papier équilibré, ce qui a l'inconvénient d'être plus long et un peu moins précis. Van

SLYEE a proposé également pour les faibles doses de précipité de terminer le dosage en évaluant le mercure contenu dans le précipité par le procédé volumétrique de PERSONNE à l'iodure de K. Cette modification est peu recommandable, car la sensibilité de la méthode est très amoindrie pour la raison inverse de celle qui la rend sensible par pesée et qui est la grosseur relative du poids moléculaire du Hg par rapport à celui de l'acétone dosé. Il semble qu'on puisse apprécier par pesée au moins jusqu'à 0 mgr. 5, soit un taux d'acide oxybutyrique égal à 0 gr. 02 par litre.

C. — *Dosage de l'acétone plus acide acétylacétique (acétone totale).*

1^o Distillation et purification du distillat. Technique courante : ayant effectué sur l'urine la réaction au nitro-prussiate, pour avoir une idée approximative du taux d'acétone, on fixe ainsi le volume de la prise d'essai ; pour une réaction très intense (correspondant de 0,50 à 2 ou 3 gr. par litre) prendre 20 ou 10 et même parfois 5 cm³.

Pour une réaction franchement rouge ou violette (0,15 à 0,60) prendre 25 cm³ ; pour une réaction rose, prendre 50 cm³.

Si la réaction est à la limite de la sensibilité ou complètement négative, prendre 100 cm³.

On mesure le volume choisi dans le ballon de l'appareil décrit plus haut, on complète à 100 cm³ avec de l'eau distillée ; on ajoute 1 cm³ environ d'acide sulfurique ou phosphorique, puis une petite parcelle de sui ou mieux de paraffine, pour éviter la mousse.

L'appareil étant monté, on distille pendant 10 minutes à franche ébullition (on obtient 30 à 40 cm³) en recueillant le liquide par le tube à boule plongé dans 10 à 20 cm³ d'eau placée dans une éprouvette ; rincer l'éprouvette avec une quantité suffisante d'eau pour faire un total d'environ 100 cm³, ajouter environ 5 cm³ de soude à 10 % de NaOH, redistiller pendant 10 minutes avec les mêmes précautions que précédemment ; en recueillant le distillat de préférence dans un flacon à émeri.

La première distillation ayant été faite comme précédemment, en présence de 1 cm³ environ d'acide sulfurique ou phosphorique, recueillir le distillat, le reverser dans un ballon et compléter avec de l'eau à 100 cm³ ajouter 10 cm³ de permanganate de K à 1 % et 10 cm³ d'acide sulfurique à 4/5^o (vol.) distiller pendant 10 minutes à vive ébullition. Ce temps est destiné à oxyder les composés à fonctions alcools qui ne sont que très imparfaitement détruits au cours de l'oxydation par Na²O², ainsi que j'ai pu le vérifier comme HUBLARD.

Recueillir le 2^e distillat, compléter à 100 cm³ avec de l'eau et ajouter

0 gr. 5 de bioxyde de sodium, ou à défaut 6 à 8 cm³ d'eau oxygénée à 12 volumes et 5 cm³ de solution de NaOH pure à 10 %. Ce dernier étant détruit, les aldéhydes préexistants ou formés au cours de l'opération précédente, en même temps qu'il retient les acides qui en résultent, ceux qui préexistaient et les phénols provenant de l'urine et surtout ceux pouvant être employés. »

Dosage des corps acétoniques dits « totaux »

On comprend sous cette désignation (1) le total de l'acétone provenant de celle qui est préexistante, de celle obtenue dans la décomposition des acides acétylacétiques par la chaleur et de celle résultant de l'oxydation sulfochromique de l'acide β -oxybutyrique. Pour l'obtenir par la méthode de VAN SLYKE, il suffit de faire le mélange : filtrat urinaire déféqué 25 cm³, eau 100 cm³, acide sulfurique dilué 10 cm³, réactif mercurique 35 cm³, porter à l'ébullition sous le réfrigérant à reflux, ajouter 5 cm³ de bichromate, chauffer 1 h. 30 et terminer comme pour le dosage de l'acide β -oxybutyrique. On peut encore, selon M. et H. LABBÉ et NEPVEUX (2) n'ajouter le bichromate qu'après 40 minutes de chauffe, la durée totale de l'ébullition étant portée à 2 h. 10'. Si l'on recourt à la méthode iodométrique, on ne fait aucune séparation entre les distillats provenant de la distillation simple et ceux obtenus après addition du mélange oxydant, qui sont redistillés ensemble.

Ce procédé est fort employé par certains auteurs ; il est un peu plus rapide que les précédents et rend des services s'il s'agit d'apprécier grossièrement le taux d'une acidose acétonémique inconnue ou de larges variations dans l'état d'un malade déterminé ; il n'est qu'un pis-aller dans les recherches précises, à cause des inconvénients qu'il présente. Au point de vue analytique pur, il rend impossible l'élimination des composés volatils, perturbateurs non retenus par la défécation et ceci peut causer des erreurs, surtout dans la méthode de VAN SLYKE, mais il est surtout critiquable par l'incertitude qui règne sur la correspondance entre le corps trouvé et les composés à doser. Le dosage fournit un poids de précipité mercurique, donc d'acétone, mais comme le rendement de l'acé-

1. Qu'il faut se garder de confondre avec le terme « acétone totale » usité plus haut.

2. *Presse médicale*, 24 février 1923, p. 173.

tone formée aux dépens de l'acide β -oxybutyrique n'est pas intégral, il faut se contenter d'exprimer le résultat tel qu'il est obtenu c'est-à-dire avec des erreurs par défaut de 15 à 25 p. 100, selon les méthodes employées, ou bien effectuer une correction hasardeuse, puisqu'on ne sait pas quelle fraction du précipité dérive de l'acide β -oxybutyrique. VAN SLYKE a cherché à tourner la difficulté en admettant que la part d'acétone provenant théoriquement de l'acide β -oxybutyrique représenterait les 75 centièmes de celle dosée dans les corps acétoniques totaux, d'où, avec une prise d'essai de 2,5 cm³, 1 mgr. de précipité vaudrait par litre 0,0264 gr. de corps acétoniques exprimés en acétone. En réalité, la proportion des constituants des « corps acétoniques » est des plus variables, et celle indiquée par VAN SLYKE ne s'applique qu'à un petit nombre de cas.

Enfin, ces résultats ainsi obtenus sont imparfaits dans leur expression même. Il s'agit de mettre en valeur des corps agissant pathologiquement, surtout par leur fonction acide. Le meilleur moyen n'est-il pas de montrer le taux absolu de ces acides, pris avec leur nom et le poids de leur molécule entière, au lieu de leur substituer ce terme d'acétone qui ne sert qu'à rappeler l'artifice analytique utilisé par le chimiste et oblige à un effort le lecteur non averti pour se reporter aux acides en cause dont l'influence pathologique est tout autre.

Une quantité aliquote des solutions d'acétone obtenues amenée à un volume connu et commode pour le calcul est mise en réaction suivant les techniques données.

CÔNCLUSION. — RÉSULTATS.

Après de nombreux dosages, l'erreur a été évaluée de 8 % avec le photomètre de VERNES, de 10 % avec l'appareil de BAUDOUIN et BÉNARD. Voici un tableau résumant les mesures faites et les comparant au dosage de l'acétone par iodométrie, ces chiffres ont été obtenus en dosant l'acétone des urines par iodométrie et par opacimétrie.

Dosages	N ^o 1 0 gr. 10	N ^o 2 0 gr. 15	N ^o 3 0 gr. 15	N ^o 4 0 gr. 20	N ^o 5 0 gr. 25
Iodométrie	0,09	0,165	0,145	0,185	0,245
Photomètre Vernes-Yvon.	0,89	0,142	0,143	0,185	0,245
Appareil Baudouin-Bé- nard.....	0,78	0,14	0,140	0,183	0,24

Dosage de l'acétone + acide acétylacétique (acétone totale) (corps ajoutés en quantités connues)

Dosages	N ^o 1 0 gr. 20	N ^o 2 0 gr. 15	N ^o 3 0 gr. 15	N ^o 4 0 gr. 25	N ^o 5 0 gr. 25
Iodométrie	0,20	0,15	0,155	0,25	0,25
Photomètre	0,21	0,14	0,150	0,24	0,23
Appareil Baudouin et Bé- nard.....	0,17	0,14	0,143	0,23	0,22

Les courses tracées montrent que l'absorption est proportionnelle aux concentrations en acétone : le dosage est toujours opéré en milieu physiquement et chimiquement identique.

QUATRIÈME DOSAGE

DOSAGE DES SUCRES RÉDUCTEURS

En présence d'un diabétique ou d'un hépatique, le taux et la variation de la glycémie sont utiles à connaître au point de vue pronostic et diagnostic, ainsi qu'au point de vue thérapeutique. Chez l'individu normal, la glycémie est de 1 gramme de glycose par litre de plasma sanguin ; si ce chiffre est à peu près constant, le régime et le travail ont une certaine influence sur le sucre, de sorte que la détermination de la glycémie doit être faite avec le sang prélevé le matin à jeun, après le repos au lit. En outre, les dosages devront être faits non sur le sang total, mais sur le plasma, car seul le sucre dissous dans le plasma intervient dans les processus physiologiques envisagés ou chez le diabétique, ces chiffres passent progressivement à 2 gr. et davantage, il y a alors hyperglycémie.

Elle est constante quand il y a glucosurie, sauf dans quelques cas exceptionnels, mais son taux ne répond pas toujours au taux de la glycosurie. Le sucre ne filtre dans l'urine que quand son taux s'élève à un certain degré ; ce degré est déjà mesuré par CLAUDE BERNARD, il a été qualifié du nom de SEUIL. Il siège entre 1,60 et 1,80, mais ce seuil varie suivant l'état morbide. Très rarement le sucre passe, alors que la glycémie est inférieure à 1,60, c'est l'abaissement du seuil.

Bien plus souvent, le sucre ne filtre que lorsque ce taux s'élève au-dessus de la normale, c'est l'élévation du seuil des diabétiques.

Si le seuil s'élevait parallèlement à la glycémie, il n'y aurait pas de glycosurie, mais le seuil de filtration s'élève moins vite que l'accumulation du sucre dans le sang. Cette différence entre le chiffre où s'établit la filtration et le chiffre réel de la glycémie et l'excès sur le seuil d'AMBARD et CHABANIER.

Dosage et microdosage des sucres réducteurs dans les liquides biologiques.

Le dosage des sucres réducteurs dans l'urine, sang et liquide, est un des plus courants et des plus utiles en biologie et en clinique. Le dosage nécessite toujours une défécation préalable du milieu où le sucre réducteur est dissous, les méthodes sont nombreuses et sujettes à discussion. Les méthodes de dosage de la glucose utilisent son pouvoir réducteur, son pouvoir rotatoire et son osazone.

Pour réaliser un dosage opacimétrique, nous pouvons utiliser l'osazone ou le pouvoir réducteur. Laissant l'osazone pour les raisons tenant à la nature du critère et à ses dimensions, nous avons cherché à obtenir soit un produit de réduction directement dosable par opacimétrie, soit un produit de transformation permettant un même dosage.

1^o Méthode par réduction et dosage direct. Les techniques susceptibles de réaliser un tel dosage peuvent s'appliquer par la réduction des sels de bismuth sur lesquels les travaux sont nombreux. L'inconvénient réside dans la couleur variable du précipité et les causes d'erreurs nombreuses au point de vue quantitatif. Le dosage opacimétrique du précipité d'oxydure obtenu à partir de la liqueur de FENLING, présente aussi des inconvénients dus également à la

variation de couleur et à la difficulté de mise en suspension du précipité.

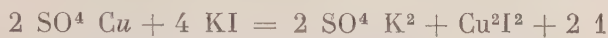
2^o Méthodes par transformation du produit de réduction.

Nous avons utilisé 2 techniques longuement expérimentées, nous avons adopté la seconde.

1^o PREMIÈRE TECHNIQUE (1).

Principe. — Le dosage des sucres réducteurs est effectué par différence, c'est-à-dire qu'on détermine le cuivre non réduit de la liqueur de FEHLING titrée après action de la solution sucrée réductrice à analyser.

La méthode est celle de LEHMANN modifiée (1) par M. GRIMBERT. Elle repose sur la réaction suivante :



L'iodure cuivreux donne un flocculum très stable, facilement dosable par néphélémétrie.

Historique. — LEHMANN et GRIMBERT, principalement RIÉGLER, MAQUENNE ET GARNIER ont étudié cette réaction, mais sa mise au point est due à M. GRIMBERT.

Construction de la courbe d'étalonnage.

A. Réactifs.

(2) Liqueur de FEHLING.

Solution A sensibilisée (formule inspirée de celle de MM. FONTÈS et THIVOLLE).

Sulfate de cuivre chim. pur.....	10 gr.
Acide sulfurique pur.....	1 cm ³ 45
Eau distillée q. s. p.	250 cm ³

Solution B :

Carbonate de soude anhydre pur ..	45 gr. 50
Acide tartrique.....	13 gr.
Eau distillée q. s. p.	250 cm ³

1. Nous avons publié cette première technique à la Soc. de Biologie, 1927. Cf. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, t. 97, p. 557 et 706.

2. En utilisant les notes signalant les causes d'erreur et leur remède.

- (2) Solution d'acide sulfurique à 1 p. 10. 250 cm³.
 (3) Solution d'Iodure de potassium à 30 p. 100 250 cm³.

B. *Réaction.*

Nous avons employé des dilutions croissantes de liqueur de FEHLING, partant d'une liqueur mère ainsi composée :

Solution A.....	1 cm ³	
Solution B.....	1 cm ³	
Eau distillée q. s. p.	20 cm ³	
En prélever.....	5 cm ³	} et les verser dans une éprouvette de 10 cm ³
—	4 cm ³	
—	4 cm ³	
—	3 cm ³	
—	3 cm ³	

Etc... (on constitue ainsi une série d'éprouvettes-étalons)

En complétant à chaque fois à..... 5 cm³

A ces 5 cm³ ajouter :

Acide sulfurique au 1/10^e 1 cm³

Agiter puis ajouter :

Solution d'Iodure de K à 30 p. 100. 1 cm³

Solution d'Hyposulfite de Na N/10. 1 cm³

Abandonner pendant 1 minute et lire la densité optique totale.

La densité optique vraie étant obtenue en lui retranchant la densité optique du milieu suspenseur.

H ² O distillée.....	1 cm ³
Hyposulfite Na N/10	1 cm ³
SO ⁴ H ² au 1/10.....	1 cm ³

Ainsi a été établie la courbe d'étalonnage qui a d'ailleurs été soumise à vérification.

Vérification. — Principe : Une solution connue de liqueur de FEHLING étant donnée, nous avons fait égir des solutions connues de glucose de concentration croissante, en adoptant la technique de FONTÈS et THIVOLLE, légèrement modifiée.

Dans une série de tubes à essais on mélange :

Liqueur A	1 cm ³
Liqueur B	1 cm ³

Chauffer à 90° environ pour sensibiliser le réactif . Ajouter :

Solution de glucose 5	p. 1.000.	1 cm ³	dans le 1 ^{er} tube
— 4,5	—	1 cm ³	— 2 ^e —
— 4	—	1 cm ³	— 3 ^e —
— 3,5	—	1 cm ³	— 4 ^e —
— 3	—	1 cm ³	— 5 ^e —
— 2	—	1 cm ³	— 6 ^e —

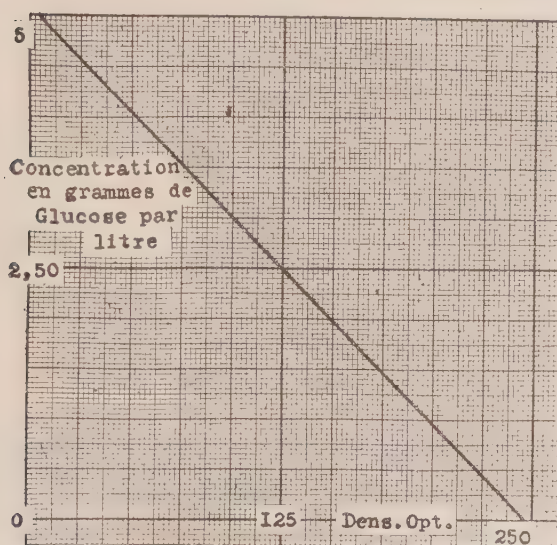


Fig. 31. — Dosage opacimétrique des sucres réducteurs par la méthode à l'iodure cuivreux. Mesure au photomètre VERNES, BRICQ, YVON.

Porter chaque tube dans un bain-marie bouillant, l'y abandonner 15 minutes pour permettre dans tous les cas une réduction totale.

Retirer le tube et ajouter :

Solution saturée de sulfate de Mg..	V gouttes
— de CO ³ Na ²	IV gouttes

Le précipité de $\text{CO}^3 \text{Na}^2$ englobe l'oxydule et facilite la précipitation.

Filtrer ou centrifuger pour séparer l'oxydule.

Laver le précipité avec :

H^2O distillée.....	4 cm^3 environ
Compléter le filtrat à	20 cm^3
En prélever.....	5 cm^3

Ajouter comme il est indiqué :

$\text{SO}^4 \text{H}^2$ 1/10.....	1 cm^3
Solution KI à 30 %.....	1 cm^3

Agiter et abandonner 20 secondes.

Ajouter :

Hyposulfite de soude N/10.....	1 cm^3
--------------------------------	-----------------

Lire la densité optique de la suspension dont on déduit la densité optique du milieu suspenseur.

La deuxième courbe ainsi déterminée est, aux erreurs d'expérience près, absolument superposable à la première.

DOSAGES OPTIQUE DES SUCRES DANS LES LIQUIDES ORGANIQUES

La réaction propre de dosage et la technique sont identiques dans les trois cas de l'urine, le sang, le liquide céphalo-rachidien, seuls les procédés de défécation diffèrent.

A. URINE.

Technique.

1^o *Défécation de l'urine :*

Urne.....	1 cm^3
Acétate neutre de Plomb.....	1 cm^3

Ajouter pour éliminer l'excès de plomb sans filtrer :

$\text{CO}^3 \text{Na}^2$ 5 pour cent	1 cm^3
HO^2 distillée q. s. p.....	10 cm^3

Filtrer.

2^o Réaction :

Liqueur A. 1 cm³

Liqueur B. 1 cm³

Sensibiliser par chauffage à 60 degrés environ.

Ajouter :

Filtrat..... 1 cm³

Porter 15 minutes au bain-marie bouillant.

Ajouter :

Sulfate magnésie V gouttes

CO³ Na². IV gouttes

Refroidir brusquement.

Filtrer ou centrifuger.

Laver le précipité. Compléter le filtrat à 20 cm³ avec l'eau de lavage.

Reprendre :

Filtrat..... 5 cm³

Ajouter :

SO⁴ H² N/10 1 cm³

KI 30 pour cent..... 1 cm³

Agiter et attendre 30 secondes.

Ajouter :

Hyposulfite N/10..... 1 cm³

Déterminer la densité optique vraie.

Le sucre en grammes par litre est le chiffre correspondant de la courbe d'étalonnage multiplié par 10, la défécation ayant entraîné la dilution au 1/10 du liquide à analyser.

Remarque. — Si la densité optique vraie est nulle, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'excès de So⁴ Cu (qui, par conséquent a été totalement réduit), la teneur en glucose est de 5 gr. par litre.

Dans ce cas reprendre la réaction comme il suit :

Filtrat..... 1 cm³

Liqueur A. 2 cm³

Liqueur B..... 2 cm³

et poursuivre comme précédemment.

Mais il est évident que dans ce cas, le taux de sucre par litre du liquide organique étudié est égal, au chiffre indiqué par la courbe plus 5 gr., ce total étant multiplié par 10.

B. SANG ET LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN.

Défécation.

Dans un petit matras de 50 cm³, mesurer :

{ Sérum sanguin ou liquide céphalo-ra- chidien	2 cm ³ 5
{ Solution de Tungstate de Na à 10 p.c. SO⁴ H² au 2/3 normal.....	2 cm ³ 5 2 cm ³ 5
{ Eau q. s. p.	12 cm ³ 5

Filtrer :

Prendre :

Filtrat (liquide céphalo-rachidien) 10 cm³

Filtrat (Sérum)..... 5 cm³

et suivre la réaction selon la technique précédente.

L'ordonnée de la courbe indique directement la teneur en sucre du liquide examiné.

Le chiffre trouvé pour le liquide céphalo-rachidien sera divisé par 2.

Remarque. — 1^o La technique générale appliquée aux solutions aqueuses de sucres réducteurs en permet le dosage. L'ordonnée de la courbe indique directement le titre en sucre de la solution.

2^o Dans le cas des solutions de lactose, la multiplication par 1,39 du titre en glucose fourni par la courbe, donne immédiatement le titre en lactose.

2^o SECONDE TECHNIQUE.

La méthode que nous préconisons est un dérivé de la méthode au mercure de MM. BAUDOUIN et LEWIN, elle-même inspirée des méthodes de KUAPT, de SAGHSIE, de TACHÉU. Cette méthode en elle-même est simple, exacte et son application aux liquides organiques nous a donné d'aussi bons résultats par notre méthode photométrique que par la méthode volumétrique des auteurs.

Dans sa méthode (1), M. le Dr BAUDOUIN emploie une liqueur à base d'iodure double de mercure et sodium que la glucose en présence réduit jusqu'à l'état mercure.

1^o Pour doser ce mercure, M. BAUDOUIN utilise une technique dont le principe est dû à LEHMAN (2). Elle consiste à ajouter au mercure réduit de l'iode en quantité déterminée et connue; une partie x sert à transformer le mercure en iodure mercurique : on dose l'excès par l'hyposulfite, une soustraction donne alors le reste x' , d'où on réduit le mercure.

2^o En vue du dosage opacimétrique, le mercure est séparé par centrifugation, puis on le lave et on le dissout dans l'acide azotique concentré. La solution mercurique est étendue et le mercure y est précipité à l'état de calomel fin par une solution chlorurée, phosphoreuse. La présence d'un léger excès de chlorure et d'acide phosphoreux assure une précipitation totale du calomel.

*Précipitation du mercure à l'état de calomel
d'une solution de nitrate mercurique.*

Réactifs. — 1^o Préparation de la solution titrée de sel mercurique à 16 % de mercure par litre.

Suivant de près la méthode et les expériences de MM. BAUDOUIN et LEWIN, nous avons préparé des réactifs correspondants aux leurs.

Nous employons une solution de sel de mercure dont 1 cm³ contient 16 mgr. de mercure capable d'être réduit par 8 mgr. de glucose.

16 gr. de mercure sont pesés en nature avec précision et mis dans une capsule de porcelaine et attaqués par 40 cm³ d'acide azotique pur ($d = 1,39$). Après dissolution vue complète à 1.000 cm³.

2^o Préparation du milieu réducteur et flocculant.

Pour obtenir une floculation complète du mercure à l'état de calomel, il faut opérer en milieu réducteur. Désirant avoir dans une même liqueur le corps réducteur et le corps flocculant, nous avons été amenés à faire une série d'essais.

A. Corps réducteur. — Il faut un composé ne réagissant pas sur les éléments en présence. Sur le conseil de M. le Professeur BOUGAULT, nous avons adopté le phosphite de soude qui donne un bon

1. BAUDOUIN, *Bull. Soc. Ch. Biol.*, déc. 1926.

2. Cf. FRANÇOIS, *J. Pharm. et Chim.*, 1921, t. 24.

milieu réducteur, sans agir sur le calomel, tandis que l'hypophosphite peut le réduire à l'état de mercure (1), nous pourrions donc en ajouter un léger excès à la quantité nécessaire.

B. *Corps flocculant.* Plusieurs chlorures sont susceptibles d'être employés. Nous emploierons le chlorure de sodium, parce qu'il est un flocculant plus doux que le chlorure d'ammonium, de plus ce dernier est susceptible d'agir sur le sel de mercure. La quantité théorique de chlorure de sodium à mettre en réaction est de 0 gr.004 pour 16 mgr. de mercure à précipiter. Nous en avons mis un léger excès dans notre réactif. Après avoir calculé les quantités théoriques nécessaires de corps flocculant et réducteur, et après avoir essayé expérimentalement l'excès optimum à employer, la formule suivante a été adoptée :

Na Cl.....	12 gr.
Phosphite de soude.....	8 gr.
Eau q. s. p.....	100 cm ³

Technique de précipitation et de mise en suspension.

Dans une série de tubes à essais de taille moyenne, on mesure dans l'ordre :

Réactif chloruré	1 cm ³
Liquide suspenseur	4 cm ³

On agite, on met quelques centimètres cubes d'eau distillée pure, puis la solution mercurique, on complète à 8 cm³ et on agite vivement.

Le trouble apparaît aussitôt et accroit vite, d'abord, puis lentement.

Rythme de flocculation. — Si on mesure le flocculum au photomètre et si on trace la courbe de flocculation, on a un long palier de mesure (2). Pour les faibles concentrations, on peut même garder longtemps les préparations stables, elles se comportent comme de véritables sols suspensoides dont elles ont les propriétés : grandes

1. G. ROUX et MAQUENNE, *Ann. de Chimie analyt.*, t. IV, p. 145, 1899 ; G. DURET, *J. de Pharm. et Chim.*, 1919, p. 340.

2. Voir la courbe.

viscosités, grains très fins visibles au microscope, stabilité, homogénéité.

Influence du temps. — La courbe tracée ci-contre montre que la réaction est complète au bout de 5 minutes.

Influence de la température. — Elle accélère la réaction, mais fait flocculer et sédimenter les préparations.

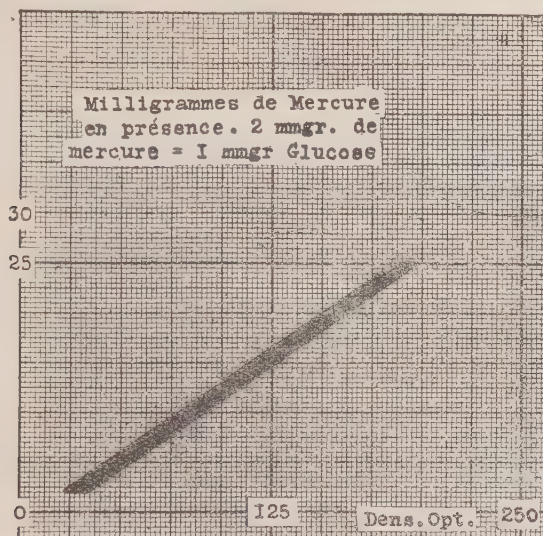


Fig. 32. — Courbe de dosage opacimétrique du glucose au moyen du photomètre VERNES, BRICQ, YVON.

Voici les chiffres lus au photomètre VERNES-BRICQ, YVON, avec des préparations à diverses concentrations (lectures au bout de 5 m.).

Glucose en mgr.	D.O. au photomètre Vernes, Bricq, Yvon		
32.....	225	220	225
24.....	165	170	167
16.....	110	120	115
8.....	60	65	60

Avec les points obtenus, il est facile de construire la courbe d'absorption en fonction de la quantité de calomel et de mercure et par correspondance en fonction de la glucose réductrice.

VÉRIFICATION DE LA COURBE.

Essai avec une solution de glucose. Nous avons vérifié notre courbe en réduisant la solution à l'iodure mercurique selon MM. BAUDOUIN et LEWIN, par une solution de glucose titrée, puis en dosant optiquement le mercure réduit les écarts ont été de 2 à 3 pour cent avec les chiffres obtenus directement avec la solution de nitrate de mercure.

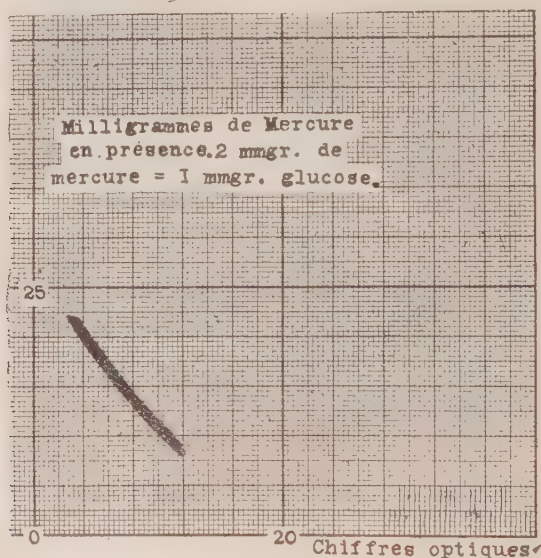


Fig. 33. — Courbe de dosage opacimétrique du glucose au moyen de l'appareil BAUDOUIN et BÉNARD.

Nous vérifierons également la courbe avec de l'urine additionnée de glucose et des préparations de sérum albumineux glucosé.

DOSAGE DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES.

Dosage du sucre du sang. — Il serait plus juste de dire dosage de la matière réductrice du sang. Nous n'ouvrirons pas ici de discussion sur la nature de cette substance et rappellerons simplement les données généralement admises. Il semble acquis qu'une défé-

cation soigneusement faite par les sels de mercure prive l'extrait de sang des substances azotées réductrices. Dans ces conditions, le produit de la réduction est bien constitué par des sucres. Ceux-ci sont vraisemblablement polymorphes, mais le glucose en forme la plus grande part.

Cela résulte des recherches des divers auteurs et en particulier de MAASE et TACHAU (1) qui, opérant sur des extraits convenablement désalbuminés et concentrés, trouvent des valeurs concordantes par la réduction et la polarimétrie. L'étude approfondie de la nature du sucre sanguin est un problème de grande importance physiologique et qui a peut-être un intérêt au point de vue clinique. Mais il est à craindre que les difficultés de technique ne le maintiennent encore pendant longtemps dans le domaine de la théorie.

La mesure courante de la glycémie comprend les temps suivants: prise de sang, désalbumination et défécation, dosage. Nous allons les envisager successivement et verrons ensuite les résultats.

A. — LA PRISE DE SANG (2).

« Chez l'homme comme chez l'animal, on peut prélever du sang dans une artère, dans une veine ou dans le réseau capillaire. Il existe des techniques qui permettent de ponctionner, chez l'homme, l'artère radiale ou l'artère poplitée. En se servant d'une aiguille fine, on ne fait courir aucun risque à son malade. Mais ces techniques assez répandues à l'étranger, sont jusqu'ici peu utilisées en France. Aussi ne parlerons-nous pas davantage du sang artériel malgré son intérêt, au point de vue glycémique.

Restent donc le sang veineux et le sang capillaire. Théoriquement ce dernier a une teneur glycémique un peu supérieure à celle du sang veineux et voisine de celle du sang artériel. Mais il faut pour cela avoir du sang capillaire vrai, coulant en gouttes serrées ; sinon, on a un mélange de sang et de lymphie tissulaire et on ne sait plus ce que l'on fait. Le sang capillaire peut s'obtenir en piquant le doigt ou le lobule de l'oreille. A notre avis, le lobule de l'oreille est préférable, car la piqûre y est beaucoup moins douloureuse. De plus, il est facile de faire rougir

1. Carl MAASE et Hermann TACHAU, *Vergleichende Blutzuckerbestimmungen durch Polarisation und Reduktionsmethoden* (Zeitschrift für Klinische Medizin, 1915, t. 81, p. 1).

2. Extrait de BAUDOUIN et LEWIN, *Dosage de la glycémie* (Bull. Soc. Biol., décembre 1926).

ce lobule par une friction au toluène, qui en plus assure l'asepsie. Une piqûre faite au vaccino-style ou à la lancette de BENSUADE permet d'obtenir très facilement le sang. Le sang veineux se prélève d'habitude au pli du coude.

La quantité de sang sur laquelle nous opérons d'ordinaire est de 1 cm³. Elle est suffisamment faible pour permettre des examens en série et permet un dosage très précis. Nous donnerons aussi une modification satisfaisant les purs microméthodistes et opérant sur 0 cm³ et même moins encore. Mais il est clair que cette réduction extrême ne peut que multiplier les causes d'erreur.

Nous opérons donc, en principe, sur 1 cm³ de sang total. On a longuement discuté pour savoir s'il est préférable d'opérer sur le sang total ou sur le plasma centrifugé. Cela se rattache à la question de la répartition du sucre entre le plasma et les globules. Elle n'a pas encore reçu de réponse définitive. Il semble cependant acquis que, *in vivo*, la grande majorité du glucose est dans le plasma ; mais qu'il se partage entre le plasma et les globules dès que le sang est extrait des vaisseaux, sans qu'aucun anticoagulant connu puisse empêcher ce phénomène. Il en résulte qu'en pratique il faut doser le sucre dans le sang total, quitte à admettre, si on le veut, que la quantité trouvée était, *in vivo*, localisée dans le plasma correspondant.

Si la prise de sang est faite dans la veine, au moyen d'une seringue RECORD soigneusement étalonnée, rien n'empêche de se servir de la graduation de la seringue pour mesurer le centimètre cube de sang. On peut aussi prendre une quantité un peu plus grande et faire écouler le sang dans un petit verre à pied où on prélèvera le centimètre cube nécessaire au moyen d'une pipette exacte. Si ce prélèvement ne suit pas immédiatement la saignée, il faudra mélanger au sang un anticoagulant ; nous nous servons d'une petite pincée de fluorure de sodium ; mais nous croyons que le prélèvement immédiat est préférable ; si l'on attend quelques heures, une faible glycolyse, est toujours à redouter, quoique l'on en dise.

A quelle dilution les opérations de désalbumination vont-elles amener le centimètre cube de sang ? A ce point de vue, les différentes techniques donnent les différences les plus grandes. Dans le procédé initial de Claude BERNARD, le sang n'était guère dilué que deux fois ; dans les micro-méthodes de BANG ou HAGEDORN, la dilution est de l'ordre du centième. La plupart des techniques colorimètres sont faites sur une dilution au dixième. Après divers essais, nous avons adopté une dilution au trentième ; mais, comme nous l'avons vu, les propriétés de la réduction mercurielle donnent beaucoup d'élasticité ; on pourra, si l'on veut, faire la dilution au vingtième et même au quinzième.

B. — DÉSALBUMINATION ET DÉFÉCATION.

Ce temps est des plus importants. La moindre trace de substance protéique trouble complètement les résultats. De plus, le sang renferme, à côté des sucres, des substances azotées réductrices, acide urique et créatinine, qui sont une grosse cause d'erreur. Pour essayer de la réduire, il y a deux manières possibles d'opérer. Ou bien on les élimine en même temps que les protéiques ; il s'agit alors de défécation associée à la désalbumination. Ou bien on les laisse passer dans le filtrat et on s'efforce de trouver, pour la réduction, une liqueur qui soit insensible à ces composés. Nous avons dit plus haut que BENEDICT cherchait à s'engager dans cette seconde voie.

La liqueur mercurielle dont nous nous servons pour la réduction est sensible à l'action de ces substances azotées. Aussi nous est-il nécessaire de les précipiter au maximum. Ce sont les sels de mercure qui sont, à ce point de vue, les meilleurs déféquants. L'un de nous (1) étudiant autrefois le sucre normal des urines, a constaté que, malgré la teneur de ce liquide en acide urique et créatinine, incomparablement plus élevée que celle du sang, on peut les priver complètement de corps azotés réducteurs par l'emploi des sels de mercure.

Deux objections ont été faites à l'emploi des sels de mercure comme déféquant du sang. MM. H. LABBÉ, NEPVEUX et NOMIDIS croient qu'ils sont susceptibles de dégager du glucose aux dépens du sucre protéidique. Ces auteurs ont opéré non sur le sang, mais sur une solution d'albumine d'œuf. On peut penser *a priori* que le nitrate de mercure, qui est très acide, peut agir sur les albumines en vertu de cette acidité. Mais nous avons observé le fait suivant. La désalbumination par le réactif de PATEIN se fait d'ordinaire en ajoutant au sang d'abord le réactif, puis a soude. Quand on inverse les temps en ajoutant au sang dilué la soude d'abord, puis le réactif, on obtient les mêmes chiffres de sucre. Cela semble réduire à peu de chose l'influence de l'acidité. Disons aussi que nous obtenons des chiffres de glycémie aussi bas qu'avec n'importe quelle méthode.

En second lieu on a accusé les sels de mercure de provoquer des pertes de sucre. D'après MM. LABBÉ et NEPVEUX, la perte serait de 5 %. Nous n'avons pas constaté ce fait en opérant sur des solutions de glucose. L'un de nous avait vu autrefois qu'en employant le nitrate mercurique, en macrométhode, ce qui diminue les chances d'erreur, celle-ci ne dépasse pas 2 %, comme l'avaient déjà constaté MM. BERRY et PORTIER.

1. GILBERT et BAUDOUIN, *Recherche et dosage des hydrates de carbone de l'urine normale. La glycurie physiologique* (*Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, juillet 1911, p. 596).

D'ailleurs, il est vraisemblable que n'importe quel agent de désalbumination peut créer des erreurs de cet ordre, du fait de l'absorption par le coagulum albumineux. On peut diminuer cette cause d'erreur en diluant suffisamment le sang. A ce point de vue la dilution au trentième que nous employons couramment donne toute garantie.

On pourrait se servir de différents sels de mercure ; on utilise le nitrate mercurique, l'acétate et le sulfate mercuriques. Nous sommes restés fidèles au nitrate mercurique facile à préparer et d'une conservation indéfinie.

Nous avons modifié le réactif classique de PATEIN de manière à obtenir un liquide nitro-mercurique qui jouisse des deux propriétés que voici : 1^o d'assurer une bonne défécation en l'ajoutant au sang volume à volume ; 2^o d'être exactement neutralisé en ajoutant au mélange sans réactif un volume de soude normal égal à celui du réactif (ou du sang). On y arrive au moyen du réactif suivant qu'il faut préparer avec grand soin.

Réactif nitro-mercurique : mettre dans une capsule de porcelaine de 1 litre 105 cm³ d'acide azotique pur, concentré (40^e Be : densité 1,383). Y ajouter peu à peu, en remuant sans cesse, 145 gr. d'oxyde rouge de mercure, en broyant avec l'agitateur les grumeaux qui tendent à se former. Agiter jusqu'à ce que l'oxyde soit presque entièrement dissous. A ce moment, ajouter 100 cm³ d'eau et faire bouillir prudemment. Tout l'oxyde se dissout. On laisse refroidir, on transvase dans une fiole de 1 litre, on ajoute de l'eau jusqu'à faire 7 à 800 cm³ et on verse en agitant 35 cm³ de soude normale. On complète au litre et l'on filtre.

Ce réactif jouit des propriétés indiquées.

Vient ici un point de technique sur lequel il est nécessaire d'insister, c'est que le caractère et les propriétés du précipité albumineux produit par le réactif nitro mercurique sont très variables avec la manière d'opérer. Quand on fait agir le réactif, puis la soude, sur du sang pur ou peu dilué (2 à 4 fois), on a un coagulum sans aucun caractère de gelée, qui filtre très rapidement et donne une grande quantité de filtrat (23 à 25 cm³ quand la dilution finale est de 30 cm³). Au contraire, quand les réactifs sont ajoutés à un sang dilué, 9, 10 fois, ou davantage, le précipité se forme sous l'aspect d'un gel noirâtre qui filtre plus lentement et donne moins de liquide. Les résultats sont un peu variables avec le sang étudié : d'une manière générale, on aura de bonnes proportions en faisant agir les réactifs sur le sang dilué quatre ou cinq fois avec de l'eau distillée, ce qui assure un laquage complet des globules rouges.

D'où la technique suivante : dans un verre à pied de 50 cm³ environ, muni d'un petit agitateur, on met d'abord 4 cm³ d'eau distillée, on ajoute 1 cm³ de sang avec une seringue ou une pipette ; on lave celles-ci

suivant le mode habituel, à moins qu'elles n'aient été étalonnées pour donner sans lavage le centimètre cube de sang. Dès que le sang est laqué, on ajoute 1 centimètre cube du réactif nitro-mercurique décrit plus haut. On agite et il se forme un coagulum noirâtre qui s'épaissit d'abord, puis se fluidifie de nouveau. On ajoute alors 1 cm³ de soude normale faite avec de la soudure du sodium. Toutes ces adjonctions de réactifs devront être faites goutte à goutte et sans agitation soigneuse pour éviter des concentrations locales qui pourraient provoquer des réactions secondaires.

La majeure partie de l'excès de mercure est récupérée à l'état d'oxyde jaune. On agite soigneusement. Après une ou deux minutes, on ajoute de l'eau distillée jusqu'à avoir un volume total de 30 cm³. Nous versons pour cela, au moyen d'une burette, 23 cm³ d'eau. On agite encore énergiquement et on jette sur un petit filtre à plis (1) placé sur une éprouvette de 30 cm³.

Le filtrat est clair comme de l'eau de roche ; il peut parfois être louche par une trace d'oxyde jaune dont on se débarrasse en repassant sur le filtre. Ce filtre est neutre et ne réagit pas sur le papier de tournesol bleu ou rouge. Il n'est pas indispensable pour obtenir ce résultat, de mesurer avec grande exactitude le réactif mercurique et la soude. Les albumines du coagulum semblent agir comme tampon et permettent, à cet égard, d'assez grandes variations.

Ce filtrat est parfaitement désalbuminé ; il renferme encore des traces de sel mercurique qui sera transformé en iodomercurate par l'iodure de la solution à réduire. Cette quantité de sel mercurique est très faible : le filtrat additionné de sulfure de sodium prend une teinte un peu noirâtre tenant à une suspension colloïdale de sulfure de mercure. Nous avons dosé sur un filtrat la quantité de sel mercurique par la méthode exposée plus haut. Il y a moins de 1 milligramme de mercure ; ce léger excès est donc négligeable à côté du taux de mercure apporté par la liqueur mercuro-sodique qui va servir à la réduction. On peut l'enlever avec un peu de poudre de zinc.

C. — RÉDUCTION.

Nous n'avons ici que peu de chose à dire et retombons dans le dosage des petites quantités de sucre.

1. Autre recommandation essentielle. Ce filtre doit être préparé en plissant un filtre à analyse en cellulose pure. Les filtres plissés que l'on trouve dans le commerce sont tous revêtus d'un apprêt qui cède des matières réductrices au filtrat, ce qui crée une cause d'erreur importante quand on opère sur de toutes petites quantités de sang (0 cm³ 2 par exemple). On peut aussi laver à l'eau bouillante les filtres du commerce et les faire sécher à l'étuve.

Nous avons vu qu'il y avait avantage à opérer sur des quantités de glucose allant de un demi-milligramme à un milligramme pour assurer une dissolution rapide du mercure dans l'iode. Si donc on a affaire à une glycémie normale, de l'ordre de 1 gramme par litre, on aura d'excellents résultats en prenant un volume de filtrat correspondant à la moitié de la solution, soit 15 cm³.

Comme l'on obtient facilement 23 à 25 cm³, cela permettra, en cas de dosages multiples, un lavage aisé de la pipette.

Si l'on s'attend à de l'hypoglycémie, on pourra ne diluer qu'à 20 cm³ et prendre 15 cm³ de filtrat. On peut également opérer sur 2 cm³ de sang 2 cm³ chacun des réactifs et étendre le tout à 30 cm³.

Le cas des hyperglycémies est plus important. Si, par l'examen clinique et surtout par l'examen de l'urine, on s'attend à une glycémie très élevée, il sera préférable de réduire la quantité de filtrat mis en œuvre. On pourra prendre 10 cm³, 5 cm³ ou même 3 cm³; on étendra avec de l'eau à 15 cm³ et on tiendra naturellement compte de cette dilution dans le calcul.

En fin de compte, les 15 cm³ du filtrat pur ou dilué seront additionnés de 1 cm³ de solution iodomercurique et de 1 centimètre cube de soude normal. Le plus souvent on n'observe aucun trouble en faisant le mélange; cependant, quand il y a un petit excès de nitrate mercurique dans le filtrat, il peut se produire un louche d'iodure mercurique qui par agitation se redissout. Très exceptionnellement la liqueur conserve une teinte jaunâtre d'aspect colloïdal qui n'a pas d'influence sur le résultat. On continue en mettant trois minutes au bain-marie, etc., etc....

Mais quelle est la quantité d'acétone susceptible d'être rencontrée? D'après les chiffres de MARRIOTT (1) et ceux de HUBBARD (2) le maximum qui ait été trouvé pour la somme acétone + acide diacétique est de 65 milligrammes par litre de sang. Supposons même 100 milligrammes d'acétone; dans cette hypothèse extrême 1 cm³ de sang apporterait 0,1 milligramme.

Nous avons préparé une solution d'acétone pure renfermant un dixième de milligramme, par centimètre cube. Nous en avons ajouté 1 cm³ à 1 cm³ de sang. En faisant les dosages à la manière habituelle on trouve pour le sang chargé d'acétone une dépense supplémentaire d'environ 0 cm³ 34 d'iode centinormal. Estimée en glucose et rapportée au litre de sang, cela fait une majoration de près de 2 décigrammes. L'erreur serait énorme pour une glycémie normale; mais il s'agit,

1. Mc Kimm MARRIOTT, *Acétone bodies content of blood in acidosis* (*J. biol. chem.*, 1914, XVIII, 514).

2. R. S. HUBBARD, *Détermination of the acetone bodies in blood* (*J. biol. Chem.*, 1921, XLIX, 382).

ici de glycémie d'acidotiques comateux et elles sont de l'ordre de 6,8 et 10 grammes. L'erreur n'est donc plus que de 2 à 3 %. En fait, étant donné les conditions extrêmes envisagées, elle est encore notablement plus faible. Pour l'annuler complètement, il faudrait enlever l'acétone en faisant passer un courant d'air dans le filtrat.

Pour les diabètes légers et moyens et les sujets normaux, l'erreur est absolument négligeable. »

RÉSUMÉ DE LA TECHNIQUE.

1° DANS LE SANG :

On place dans un verre à pied 4 cm³ d'eau distillée ; on y ajoute 1 cm³ de sang, ensuite 1 cm³ de réactif nitro-mercurique, puis 1 cm³ de soude normale, tout cela peu à peu et sous forte agitation. Après quelques minutes de repos, on ajoute 23 cm³ d'eau pour compléter à 30 cm³. On filtre sur un filtre à analyse préalablement plissé.

Le filtrat clair et incolore est neutre. Dans une fiole d'ERLENMEYER de 50 cm³ on place dans l'ordre :

15 cm³ de filtrat (sauf si hyperglycémie. Voir plus haut).

1 cm³ de liqueur d'iode mercurate.

1 cm³ de soude normale.

on fait la réduction.

2° DANS LE LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN :

La technique est calquée sur celle du sang avec quelques modifications résultant de la faible teneur en albumine.

On met dans un verre 4 cm³ d'eau et 1 cm³ de liquide céphalo-rachidien. On ajoute 0 cm³ 2 de réactif nitro-mercurique et 0 cm³ 2 de soude normale. Après deux ou trois minutes, on complète à 30 cm³. On filtre.

Sur 15 cm³ du filtrat, parfaitement limpide et désalbuminé on continue comme pour le sang.

Technique de dosage opacimétrique avec les liquides biologiques.

1° Sang et liquide céphalo-rachidien. — Il convient de suivre exactement la technique de MM. BAUDOUIN et LEWIN ; si la prise d'essai contient plus de 8 milligrammes de glucose, on refait la

réaction avec une prise d'essai moitié plus faible. Quand la réduction est opérée on lave le mercure puis on le dissout dans 1 cm³ d'acide azotique concentré et pur.

On ajoute 2 cm³ d'eau, puis 1 cm³ du réactif chloruré puis de suite 4 cm³ du liquide suspenseur, on agite, on attend 4 à 5 minutes et on mesure l'opalescence, soit D' on fait un liquide témoin avec :

Eau.....	3 cm ³
Réactif-chloruré.....	1 cm ³ ..
Liquide suspenseur	4 cm ³

et on prend l'opalescence soit D''

On a $D' - D'' =$ opalescence vraie.

2° *Urines*. — On opère sur l'urine déféquée par le réactif de PATEIN, on enlève rapidement le mercure du réactif en agitant violemment pendant 5 minutes avec de la poudre de cuivre ou de zinc.

On opère sur une quantité d'urine renfermant moins de 8 mgr. de glucose.

CONCLUSION. — Le précipité de calomel fin en suspension dans un milieu intergranulaire défini se prête bien à un dosage opacimétrique. L'absorption est proportionnelle à la concentration.

La technique répond aux desiderata d'une telle méthode en éliminant tout facteur variable.

SIXIÈME DOSAGE

DOSAGE DE LA CHOLESTÉRINE

Cholestérine. — Normalement le sérum contient 1 gr. 60 de cholestérine chez l'homme, 1 gr. 80 chez la femme. Il y a hypercholestérinémie pendant la période menstruelle (3 jours avant les règles et durant celles-ci le maximum ayant lieu le 4^e jour de l'écoulement).

Cette augmentation existe de façon temporaire pendant la grossesse, surtout après le 7^e mois (2 à 3 gr.) puis cesse après l'accouchement, la normale n'étant atteinte que 3 ou 4 mois après.

Il y a hypercholestérinémie chez les brightiques, les artério-scléreux, les goutteux, les lithiasiques chroniques : la constatation d'un chiffre élevé chez ces derniers doit faire craindre des précipitations calculeuses ; elle est la preuve que ce trouble morbide ne cesse pas d'évoluer. Au contraire les infections aiguës au moment de la période d'état, donnent lieu à de l'hypercholestérinémie suivie d'hypocholestérinémie au moment de la convalescence (typhoïde, broncho-pneumonie grippale, septicémie, poussée évolutrice fébrile de la tuberculose).

Dans l'insuffisance surrénale et la maladie d'ADDISON il peut y avoir hypercholestérinémie.

Méthode générale de dosage de la totalité des lipoides.

Cette méthode comporte dans ses grandes lignes les opérations suivantes :

Traitement du sérum par l'alcool pour éliminer les matières protéiques ; dosage de la cholestérine libre par le procédé de WINDAUS à la digitonine ; saponification des lipoides phosphorés, des graisses neutres et des éthers de la cholestérine et leur dosage ; enfin déterminer les acides gras par différence.

I. — EXTRACTION.

On opère sur 20 cm³ de sérum auxquels on ajoute 100 cm³ d'alcool à 95°. Après un contact de 6 heures, on filtre en se servant pour cela de la cartouche de papier de l'appareil de KUMAGAWA et SUTO dans laquelle on entraîne finalement le coagulum de matières protéiques. Le filtrat est mis à part et on procède à l'épuisement du résidu dans l'appareil de KUMAGAWA et SUTO au moyen de 50 à 60 cm³ d'alcool à 95°.

Les solutions alcooliques étant réunies, on distille l'alcool et on s'arrête quand il ne reste plus dans le ballon qu'un volume de 30 cm³ environ. Le liquide encore chaud est transvasé dans une capsule plate en porcelaine et évaporé au bain-marie. On achève la dessiccation de l'extrait par un séjour de quelques heures à l'étuve à 50°.

Au sortir de l'étuve, l'extrait est traité par l'éther anhydre (ob-

tenu par distillation sur le sodium). Ce traitement est répété jusqu'à ce que le liquide d'épuisement ne laisse plus de résidu à l'évaporation.

Les solutions éthérées réunies sont alors centrifugées dans des tubes à bec de 40 cm³ de capacité, puis décantées dans une capsule tarée et évaporées à basse température.

L'extrait éthéré obtenu est séché à 50° et pesé. La connaissance de son poids donnera une idée approximative et indiquera plus tard ; la quantité d'alcali nécessaire pour la saponification. Il représente à l'état brut la totalité des graisses neutres, des acides gras préexistants, des lipoides phosphorés et de la cholestérine soit libre, soit éthérifiée.

II. — DOSAGE DE LA CHOLESTÉRINE LIBRE.

La cholestérine peut exister dans le sérum à l'état libre ou à l'état d'éther oléique. Pour doser la cholestérine libre, on met à profit la propriété qu'elle a de donner avec la digitonine un complexe insoluble dans l'alcool à froid et dans l'éther ; dans les mêmes conditions, les éthers de la cholestérine ne donnent rien (WINDAUX). Il faut opérer en milieu alcoolique. La combinaison se produit entre 1 partie de cholestérine et 3 parties de digitonine. Le complexe se forme à l'ébullition et se sépare par refroidissement on le purifie et on le pèse après dessiccation. Voici comme il convient d'opérer :

Soit 0 gr. 20 le poids d'extrait éthéré obtenu dans l'opération. On le dissout à chaud dans 50 fois son poids d'alcool absolu (10 cm³). Le liquide porté à l'ébullition est additionné d'une solution bouillante de digitonine dans l'alcool absolu. Pour la plupart des sérums humains, il suffit de mettre un poids de digitonine égal à la moitié de celui de l'extrait ; pour les sérums ictériques, il peut être nécessaire d'augmenter sensiblement cette quantité. Nous nous sommes assurés d'ailleurs qu'un excès de digitonine ne faussait pas les résultats.

Dans l'exemple choisi, nous ajouterons donc 10 cm³ d'une solution de digitonine à 1 p. 100.

En tenant compte de l'évaporation, le volume total est d'environ 18 cm³. Pour déterminer la précipitation du complexe, il faut faire tomber le titre alcoolique de 95°, en ajoutant de l'eau distillée.

Dans notre cas, nous verserons donc 1 cm³ 1/2 d'eau distillée. Le complexe se précipite aussitôt.

Courbe d'absorption du précipité.

Nous avons cherché à établir une courbe d'absorption avec le précipité de digitonide de cholestérol, afin de rendre plus rapide le dosage de la cholestérine.

Technique. — Des quantités croissantes de cholestérine de 0 mgr. 01 à 20 mgr. sont disposés dans des tubes contenant chacun

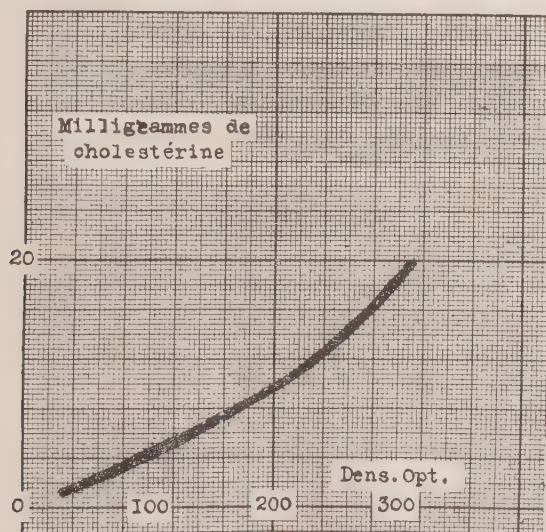


Fig. 34. — Courbe du dosage opacimétrique de la cholestérine au moyen du Photomètre VERNES, BRICQ, YVON.

10 cm³ d'alcool absolu (au voisinage d'une température de 100 degrés. Après dissolution, on ajoute 10 cm³ d'une solution de digitonide à 1 pour 100. On met le mélange à refroidir et au bout de 10 minutes on ajoute une quantité suffisante d'eau pour faire 20 cm³. Le titre alcoolique tombe en dessous de 95 degrés et le complexe insoluble précipite. On le centrifuge, on le lave à l'alcool à 95 degrés, on le centrifuge et on le remet en suspension dans l'alcool à 95 degrés.

On attend 30 minutes et on mesure l'absorption au photomètre.

En plus du dosage de la cholestérine libre, on peut saponifier les lipoides phosphorés, les graisses neutres et les éthers de la cholestérine, puis faire le dosage ; on peut enfin déterminer les acides gras par différence.

Dans ce but nous reproduisons la technique à suivre selon MM. GRIMBERT et LAUDAT (1).

Les solutions alcooliques réunies contiennent, en plus des matières grasses et des lipoides, de la digitonine en excès dont il faut se débarrasser. A cet effet, elles sont concentrées à un faible volume (20 cm³) que l'on verse encore chaud dans un grand excès d'éther (100 à 150 cm³) auquel on ajoute les solutions étherées qui ont servi à laver le complexe. La digitonine insoluble se précipite. Après une heure de repos, le liquide est décanté et centrifugé et le précipité lavé plusieurs fois à l'éther. Les solutions étherées réunies sont distillées et le résidu est repris par l'alcool pour être saponifié.

Saponification.

La solution alcoolique précédente est chauffée pendant 3 heures au bain-marie dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant avec de la potasse en solution dans l'alcool à 70 degrés au titre de n/2,5 à raison de 25 cm³ pour 0 gr. 20.

L'alcool étant chassé par distillation, on reprend le résidu par un peu d'eau chaude, on met les acides gras en liberté par addition d'acide azotique dilué et on épuise le tout à deux reprises par de l'éther. La couche aqueuse est soutirée et mise à part pour le dosage du phosphore provenant de la décomposition des lipoides phosphorés et la solution étherée est lavée soigneusement à l'eau distillée pour enlever toute trace d'acidité, puis évaporée. Le nouvel extrait maintenu à l'étuve à 50 degrés pendant une heure est repris par de l'éther anhydre, la solution étherée centrifugée et décantée est évaporée de nouveau.

Le résidu est séché à l'étuve à 50 degrés pendant 4 à 5 heures pour insolubiliser les pigments ; on le reprend par de l'éther de pétrole, qui laisse après évaporation et dessiccation à 50 degrés un résidu renfermant un mélange d'acides gras et de cholestérine.

1. GRIMBERT et LAUDAT, *J. de Pharm. et Chim.*, janvier et février 1914

Dosage de la cholestérine éthérifiée.

L'extrait éthéré renferme la totalité des acides gras provenant soit des graisses neutres, soit des lipoides phosphorés (lécithines), soit des éthers de la cholestérine, ainsi que ceux qui préexistaient à l'état libre dans le sérum sanguin ; il renferme de plus la cholestérine libérée de ses combinaisons éthérées. Pour doser cette dernière, on peut suivre le procédé par combinaison avec la digitonine.

En retranchant du poids celui de la cholestérine ainsi déterminée, on obtient par différence celui des acides gras totaux.

Dosage des lipoides phosphorés.

Le liquide aqueux est évaporé au bain-marie dans un large creuset de Saxe, puis calciné modérément.

La quantité d'alcali introduite pour obtenir la saponification et l'acide azotique ajouté ensuite, suffisent pour fixer le phosphore et pour aider à la destruction complète de la matière organique. On laisse refroidir et on reprend la masse fondue par un peu d'eau acidulée par l'acide azotique. On porte à l'ébullition pour assurer la dissolution complète des sels et pour chasser les produits nitreux qui ont pu se former. Après refroidissement, la solution est filtrée et reçue dans un gros tube à centrifuger, taré, à fond plat, d'une capacité de 30 cm³. On lui ajoute à l'aide d'un tube effilé pour éviter le mélange immédiat 10 à 20 cm³ de réactif molybdique, selon la quantité présumée de phosphore et surtout selon le volume total du mélange. Après une heure de repos, on agite plusieurs fois le tube et on le laisse ensuite pendant cinq heures à l'étuve à 40 degrés. Le phosphomolybdate précipité est centrifugé, on le lave d'abord avec de l'eau contenant 5 p. 100 de réactif molybdique, puis avec quelques centimètres cubes d'eau distillée ; on décante de nouveau et l'on sèche le tube et son contenu à 100 degrés jusqu'à son poids constant.

Le poids de phosphomolybdate divisé par 2,3 donne le poids des lipoides phosphorés exprimés en lécithine distéarique contenue dans la prise d'essai.

Voici à titre d'exemple, quelques résultats obtenus par cette méthode avec des sérums normaux et des sérums de malades. Ces résultats sont exprimés en grammes et rapportés au litre de sérum.

Chez les individus normaux, la cholestérine libre représente en général $1/5$ à $1/4$ du poids de la cholestérine totale.

Chez les brightiques et les lipémiques, ce rapport reste sensiblement le même, malgré l'augmentation du taux de la cholestérine totale.

	Cholestérine			Lécithine	Acides gras libres et acides gras des graisses	Observations
	libre	éthérifiée	Totale			
Sérums normaux.	0,36	1,38	1,74	1,19	2,50	4 h. après ingestion de graisses.
	0,51	1,44	1,95	1,40	2,72	Brightique
	0,65	1,95	2,60	2,10	3,93	<i>id.</i>
	0,46	1,72	2,18		3,86	Ictère catarrhal.
	0,78	2,04	2,82		4,27	Ictère lithiasique.
	1,58	1,22	2,80	1,05	4,24	Kanthôme.
	6,05	0,92	6,97	6,89	7,59	<i>id.</i>
	1,69	3,53	5,22	2,06	4,28	
	2,14	3,44	5,58	5,06	37,82	

Chez les ictériques par rétention, la cholestérine libre l'emporte de beaucoup sur la cholestérine éthérifiée, en même temps que la totalité des lipoides subit un accroissement parfois considérable.

Dosage en bloc de la cholestérine totale.

Si l'on ne tient pas à doser séparément la cholestérine libre et la cholestérine éthérifiée, on peut apporter à la technique que nous venons de décrire les modifications suivantes qui suppriment l'emploi de la digitonine.

L'extrait alcoolique obtenu, comme il est dit est saponifié immédiatement et soumis aux manipulations qui conduisent à l'obtention d'un extrait éthéré repris à l'éther de pétrole, lequel renferme les acides gras et la cholestérine totale, qu'on dose. Pour séparer la cholestérine de ce mélange, on a recours au procédé de KUMAGAWA (1).

1. A. GRIGAUT, *Le cycle de la cholestérine*, G. Steinheil, éditeur, Paris.

L'extrait éthéré dont on connaît le poids, est dissous dans de l'éther de pétrole, on ajoute quarante fois son poids de potasse alcoolique N/5, puis après agitation, une quantité égale d'eau distillée.

L'éther de pétrole se sépare en enlevant la cholestérine. Un deuxième traitement par le même éther assure l'épuisement complet. La totalité des liqueurs éthérées est évaporée et le résidu est repris par de l'alcool chaud. On ajoute 1 cm³ de soude alcoolique à 1 p. 100, ou tout simplement une goutte de lessive de soude. On évapore le mélange au bain-marie jusqu'à siccité, puis on le maintient à l'étuve à 100° pendant une heure. On le reprend alors par de l'éther de pétrole que l'on verse dans la capsule encore chaude. Par le repos, les impuretés se déposent ; la couche éthérée est filtrée sur amiante, ou mieux centrifugée ; on lave avec soin la capsule de l'entonnoir ou le tube à centrifuger avec de l'éther de pétrole qu'on réunit au premier et le tout est abandonné à l'évaporation spontanée dans un petit cristallisateur taré.

La cholestérine cristallisée à l'état de pureté sous forme de longues aiguilles soyeuses. On dessèche à 100° jusqu'à poids constant et on la dose ou on la pèse.

CONCLUSION,

Dans notre étude du dosage du cholestérol, nous avons surtout montré la possibilité d'un dosage opacimétrique, où l'absorption est proportionnelle à la teneur en digitosonide de cholestérol. Cependant la technique à suivre est délicate et demande une main entraînée : dans ce cas, elle donne des résultats parallèles et comparables à la méthode pondérale.

II

DOSAGE DES CONSTITUANTS DES LIQUIDES BIOLOGIQUES PRÉCIPITÉS A L'ÉTAT MICRO- CRISTALLIN : CALCIUM ET URÉE

SEPTIÈME DOSAGE.

1^o DOSAGE DU CALCIUM

Le calcium est un des éléments dont l'intérêt et le rôle est le plus grand en biologie et aussi en clinique ; « son rôle en Biologie » a été bien présenté par G. BOINOT (1).

Son intérêt clinique croît chaque jour, mais l'étude du calcium en clinique médicale est un champ immense et aride. Cela tient en partie à la difficulté de son dosage qui nécessite une manipulation au courant de l'analyse et souvent de la microanalyse. Le calcium est partout dans l'économie, tissus osseux, cartilagineux, musculaire, nerveux, glandulaire (2). Les dosages du calcium dans le lait, l'urine, le sang sont les seuls demandés aujourd'hui. Ce sont les seuls que nous envisagerons.

Les moyennes individuelles des laits de femme comparées entre elles, présentent de grandes divergences et des laits du même âge peuvent avoir des compositions très différentes.

En outre, le lait présente des variations importantes à divers moments de la journée ; elles sont énormes pour le beurre et peuvent atteindre des coefficients allant de 1 à 5 (le maximum étant atteint à 3 h. de l'après-midi) ; pour la caséine, les variations sont moindres mais non négligeables (de 1 à 1.3) ; ici encore l'influence du repas de midi et celles d'autres facteurs d'ordre physique

1. G. BOINOT, thèse Dr en Pharmacie. Nancy.

2. HUGOUNENQ, *Chimie physiologique et pathologique*, p. 193, 3^e édition, Doin.

comme les radiations lumineuses exercent leur action. En ce qui concerne la lactose, les chiffres obtenus sont sensiblement constants.

Enfin, la composition du lait se modifie au cours d'une même tétée ; les variations de la caséine sont de l'ordre de 20 pour 100 environ.

Sous ces réserves, indiquons les chiffres extrêmes trouvés par les différents auteurs pour la teneur de 1.000 de lait en calcium :

Lait de femme	Ca pour 1.000	= 0.14 à 0.36
Lait de vache	— — —	= 0.85 à 1.28
Lait d'ânesse	— — —	= 1.07 à 1.28
Lait de jument	— — —	= 0.72

Le lait de femme est donc, de beaucoup, le moins riche en Ca ; nous verrons plus loin comment on peut expliquer ce fait ; en tout cas, il est important à connaître en pédiatrie lorsqu'il s'agit de substituer l'élevage au biberon à l'allaitement par la mère.

Pour les excréta, si l'on se rapporte au tableau relatif aux entrées des minéraux et à leurs sorties par les urines et les fèces, on trouve pour le Ca urinaire éliminé quotidiennement par un sujet normal le chiffre de 0 gr. 396 de Ca (OH)² soit 0.214 de Ca. Ce chiffre obtenu par LEMATTE et nous-même représente une moyenne de nombreux résultats analytiques. Il est du même ordre de grandeur que ceux donnés par divers auteurs, YVON (1), RONCHÈSE (2).

L'élimination moyenne par les urines est donc :

Par litre : 0.164 (en Ca).

En 24 heures : 0.214 (en Ca).

Par Kilog d'individu : 0.0033 (en Ca).

Le taux de Ca urinaire peut présenter des variations sensibles qui, nous l'avons vu, sont influencées notamment par la qualité du régime alimentaire.

C'est ainsi que la Ca éliminé par les urines augmente à la suite de l'ingestion de boissons en quantité abondante (SCHETELIG)

1. YVON, *Analyse des urines*, p. 206, 6^e édition. Doin, Paris, 1901.

2. RONCHÈSE, *Guide pratique pour l'analyse des urines*, p. 144, 2^e édition. Baillièrre, Paris, 1915.

ainsi que sous l'influence du travail intellectuel (GRIMMÉ) (1).

« Pendant la période moyenne de la gestation, l'élimination de la chaux est accrue tandis qu'elle diminue à la fin de la grossesse (BAR et DAUNAY). La première partie de cette observation s'expliquerait par une mobilisation des réserves calcaires de l'économie au moment où le fœtus n'en aurait pas encore besoin. Une utilisation brusque des sels de chaux par le fœtus correspondrait, dans les dernières semaines de la gestation à la diminution de l'élimination de la chaux. » (RÔNCHÈSE.)

Pour le sang total, HUGOUNENQ (2) indique, d'après C. SCHMIDT une teneur en calcium pour le sang total d'un homme de 25 ans de 0.0714 pour 1.000 de sang. BUNGE (3) obtient 0 gr. 069.

Les valeurs moyennes obtenues par JANSEN (4) vont de 0.075 à 0.089.

JONES et NYE (5) ont étudié le taux de Ca chez des enfants ; ils ont trouvé des chiffres variant de 0.056 à 0.124 et indiqué une moyenne de 0.094. Ces variations n'accusent aucune relation entre l'âge et la teneur en calcium ; en outre, il semble permis d'incriminer la méthode néphélométrique employée par les auteurs.

KRAMER et TISDALL (6) ont trouvé des chiffres allant de 0.053 à 0.067.

BINET et BLANCHETIÈRE ont observé que le sang veineux est presque toujours plus riche en Ca que le sang artériel.

LE CALCIUM DU PLASMA.

L'artifice habituellement employé pour empêcher la coagulation du sang, qui consiste à l'additionner d'oxalate de potasse, ne peut naturellement pas être utilisé. Les savants qui se sont attachés au dosage du Ca dans le plasma sont relativement peu nombreux : parmi eux, il faut citer surtout Léon BLUM et ses élèves qui ont employé l'hirudine ou ont recueilli le sang dans un tube paraffiné

1. GRIMMÉ, *Dosage du Ca en physiologie*. Thèse Doct. ès sciences à Fribourg, p. 36, 1906.

2. HUGOUNENQ, *Chimie physiologique et pathologique*, p. 213, 3^e éd., Doin, Paris, 1912.

3. BUNGE, *Chimie biologique*, p. 222. Masson, 1891.

4. W. H. JANSEN, *Zeitsch. für physiol. chem.*, t. 101, p. 176, 1918.

5. JONES et NYE, *Journ. of biol. Chem.*, juillet 1924.

6. KRAMER et TISDALL, *Journ. of biol. chem.*, août 1922.

maintenu dans un mélange réfrigérant (TSCHIEMBER) (1). Nous ne ferons état que des résultats obtenus par les analyses de cette école ; ils varient de 0.090 à 0.100 de Ca pour 1.000 de plasma.

LE CALCIUM DU SÉRUM.

La plupart des auteurs ont fait leurs recherches sur le sérum, produit résultant normalement de la coagulation du sang. Nous croyons utile de reproduire les chiffres obtenus par les différents auteurs (en calcium pour 1.000 gr. de sérum) en indiquant la méthode de dosage qu'ils ont utilisée :

HALVERSON, MOHLER et BERGEIN (2) ..	0.090 à 0.110
JANSENS.....	0.090 à 0.112
	(Jansen)
MATTEWS (3).....	0.090 à 0.110
	(Kramer et Tisdall)
HIRTH et KLOTZ (4).....	0.105 à 0.110
	(de Waard)
—	0.094 à 0.093
	(Micro-Richard)
—	0.097 à 0.098
	(Macrodosage)
WEILL, GUILLAUMIN, WEISSMANN-NET- TER (5).....	0.108 à 0.110

LE CALCIUM DES GLOBULES.

Malgré le grand nombre de dosages du Ca pratiqués sur le sang, le plasma ou le sérum, il est difficile de se faire une opinion précise sur la répartition du Ca entre les divers éléments du sang. En particulier, les renseignements recueillis sur le Ca des globules sont parfaitement contradictoires.

1. CL. TSCHIEMBER, *La calcémie dans les états pathologiques*. Thèse doct. méd. Strasbourg, 1924, p. 11.
2. HALVERSON, MOHLER et BERGEIN, *Journ. of biol. Chem.*, t. 32, p. 171.
3. MATTHEWS, *Physiological Chemistry*, p. 1076, 4^e éd. New-York, 1917-1925.
4. HIRTH et KLOTZ, *C. R. Soc. Biol.*, t. 88, p. 1153, 1923.
5. M. P. WEILL, C. O. GUILLAUMIN, WEISSMANN-NETTER, *C. R. Soc. biol.*, 1923, t. 88, p. 732.

C'est ainsi que pour SCHMIDT (1), le calcium contenu dans 1.000 gr. de globules serait de 0,0345. KRAMER et TISDALL, opérant sur le sang de sept sujets, ont pratiqué le dosage du Ca sur le sang total d'une part, et sur le plasma d'autre part. S'appuyant sur ce dernier chiffre et sur la teneur du sang en globules, ils ont calculé le Ca contenu dans le plasma de 100 cm³ de globules ; ils ont trouvé des chiffres compris entre + 1,0 et — 1,2. Ils déduisent de ces résultats que les globules ne contiennent pas de Ca.

JONES et NYE ont déterminé en même temps que le Ca du sang total celui des globules et du plasma : il ressort des chiffres publiés que les globules seraient aussi riches en Ca que le plasma.

Les seuls travaux que nous possédions sur cet important sujet se contredisent donc formellement et il serait impossible de se former une opinion si la technique de leur exécution offrait les mêmes garanties : les travaux de SCHMIDT et de JONES et NYE ont été faits directement sur les globules ; on sait que la séparation de ces éléments est délicate, et il est permis de se demander si les auteurs ont résolu ce problème sans provoquer des échanges entre les globules et le plasma. En outre, les dosages de JONES et NYE ont été faits par voie néphélométrique et nous disons d'autre part combien ce procédé analytique est sujet à caution. Au contraire, KRAMER et TISDALL ont pratiqué leurs dosages du Ca sur le sang total et sur le plasma par un procédé longuement étudié et qui est l'un des meilleurs que nous possédions à cet effet. Nous pencherions donc à adopter leurs conclusions et à admettre avec eux que les globules interviennent pour une part négligeable dans le Ca du sang total.

SUR QUOI DOIT-ON PRATIQUER LE DOSAGE DU CALCIUM SANGUIN ?

On conçoit, s'il en est vraiment ainsi, le peu d'intérêt qui s'attache à l'étude du calcium du sang total qui contiendrait alors en proportion variant dans de larges limites, l'élément significatif : le plasma. En effet, les échantillons de sang étudiés par KRAMER et TISDALL possèdent une teneur en plasma allant de 56 à 72 p. 100. Le taux du plasma en Ca pourrait dans ces conditions être constant, comme il semble d'ailleurs que ce soit le cas, alors que le sang total accuserait des divergences de près de 30 p. 100.

1. SCHMIDT in HUGOUNENQ, *Chimie physiologique et pathologique*, 1912, 3^e éd. Doin, Paris, p. 243.

Certains auteurs fournissent encore d'autres raisons de pratiquer le dosage sur la partie liquide du sang. Citons M^{lle} TSCHIEMBER (1) .

« Pour l'étude des phénomènes humoraux, seule la partie liquide du sang importe. Seules les parties minérales de la partie liquide interviennent dans les échanges avec les tissus...

« La plupart des analyses ont été faites sur le sérum. La formation du sérum est liée à un processus où le calcium joue un rôle : la production de la fibrine. On ne sait pas encore si cette transformation du fibrinogène en fibrine est liée à une modification du Ca sanguin, et l'importance de cette modification. On ignore également si elle se fait toujours dans le même sens.

« Pour ces motifs, seules les analyses faites sur le plasma échappent à la critique et donnent la garantie nécessaire. »

Signalons les variations du taux du calcium dans les états pathologiques (2).

« Chez l'individu vivant, si l'on veut aller plus loin que ne le permet la chimie des excréta, le sang est le seul témoin des échanges qu'on puisse sans inconvénient prélever assez fréquemment et soumettre à l'analyse : aussi l'étude de la calcémie au cours des divers états pathologiques domine-t-elle l'ensemble des travaux que ce sujet a inspirés. Après la mort, des os ont pu être prélevés et leur teneur en Ca déterminée : il s'agit là, en effet, d'organes dont la minéralisation est bien et depuis longtemps établie. Mais la chimie des autres organes (surtout en ce qui concerne les organes humains) est, pour plusieurs raisons, encore mal connue et n'est pas, quant à présent, susceptible d'applications intéressant la pathologie.

« Nous ne nous arrêterons donc qu'aux résultats qui semblent définitivement acquis. Nous examinerons d'abord les altérations de la composition des os puis les troubles de la calcémie au cours ou comme conséquence de certains états pathologiques. Enfin, nous indiquerons quels sont les facteurs susceptibles d'entraîner des variations du Ca urinaire.

1. Cl. TSCHIEMBER, *La calcémie dans quelques états pathologiques* Th. Doct. Méd. Strasbourg, 1924, p. 10.

2. Extr. de la Thèse de G. BOINOT. Fac. de Pharm. Nancy.

Altérations et maladies des os.

« Nous avons rappelé que la partie solide de l'os est formée d'une substance albuminoïde, l'osséine, imprégnée de sels alcalino-terreux avec prédominance de $(\text{PO}_4)^2\text{Ca}^3$. Ces sels minéraux forment de 60-70 p. 100 du poids de l'os et le phosphate tricalcique environ 85 p. 100 des substances minérales totales.

« Certains états pathologiques (A. GAUTIER) (1) modifient par un processus variable la proportion des sels minéraux, le plus souvent dans le sens de la diminution de ces éléments rarement dans le sens de l'augmentation.

« C'est ainsi que dans l'ostéomalacie, les os subissent une modification profonde ; les cellules osseuses s'atrophient, la matière organique se gonfle, les stigmates de dégénérescence apparaissent et se manifestent par l'augmentation de la teneur en matières grasses.

« Parallèlement, le taux des sels de chaux diminue. A. GAUTIER reproduit l'opinion de C. SCHMIDT d'après lequel on trouverait dans les os d'ostéomalaciques de l'acide lactique libre ; mais il n'est pas établi que la présence de cet élément soit la cause de l'altération de l'os. BLUM, DELAVILLE et CAULAERT (2) examinant le sang d'une femme atteinte d'ostéomalacie trouvent des teneurs en Ca inférieures de 15 à 30 p. 100 aux chiffres normaux. Ces auteurs ont constaté chez cette même malade que la presque totalité du Ca sanguin est ultrafiltrable alors que dans le sang normal, il n'y a que 60 à 70 p. 100 qui le soit.

« Le rachitisme trouve son origine dans une prolifération excessive des éléments du cartilage destiné à disparaître à l'état normal par envahissement du tissu osseux. Celui-ci étant troublé dans sa formation, l'os ne s'incrute de sels terreux que d'une façon imparfaite et incomplète. Il n'y a pas de dégénérescence de la matière organique ; aussi les graisses n'augmentent pas, mais la partie minérale de l'os est fortement diminuée et peut ne représenter que la moitié ou le tiers de la quantité normale.

« Sous l'influence d'une nourriture très pauvre en sels de Ca les os s'altèrent. Mais il n'est possible de produire ainsi le rachitisme

1. A. GAUTIER, *Leçons de Chimie biologique*, 2^e éd., 1897, p. 307.

2. BLUM, DELAVILLE et CAULAERT, *C. R. Soc. biol.*, 1924, t. 93, p. 511.

que chez de jeunes animaux en cours de développement. Chez les adultes, la privation de sels terreux détermine une déminéralisation progressive entraînant une lente transformation des os qui deviennent plus poreux qu'à l'état normal. Dans ce cas, A. GAUTIER rappelle qu'il ne suffit pas d'ajouter à l'alimentation de la poudre d'os ou du phosphate de chaux pour qu'il y ait assimilation de ces substances minérales et récupération du Ca par le tissu osseux déficient ; il est nécessaire que ces éléments soient présentés à l'organisme tels qu'ils existent notamment dans le pain, l'œuf ou la viande, c'est-à-dire à l'état de combinaison organique.

« Dans la carie osseuse, la proportion des éléments minéraux qui est de 60 à 70 p. 100 du poids total de l'os tombe à 50 et parfois à 30 p. 100.

« Enfin, le cal, masse osseuse de néo-formation qui réunit les fragments d'un os fracturé, est sensiblement moins riche en Ca que l'os.

« Le taux du Ca est rarement augmenté sous l'influence d'états pathologiques : les auteurs n'ont guère observé cette augmentation que dans la nécrose ou gangrène des os.

« La gangrène étant « un processus morbide essentiellement caractérisé par la mortification des tissus et leur putréfaction » (ROGER) (1), il est naturel que la teneur en Ca des os nécrosés augmente et même fortement, en valeur relative par suite de la résorption progressive de la matière organique.

Les variations du Ca du sang dans quelques états pathologiques.

« Nous avons vu que, chez le sujet soumis à un régime alimentaire normal, le taux du Ca sanguin présente une fixité remarquable.

« Le mécanisme régulateur de la calcémie paraît être si parfait que l'administration de doses massives de Ca n'entraîne guère de modifications. ACHARD (2) rappelle qu'un régime fortement calique n'augmente pas la calcémie. DENIS et MINOT n'ont pu l'élever en faisant ingérer, dix jours de suite, 6 gr. de lactate de Capar jour.

1. ROGER, *Introduction à l'étude de la médecine*, 8^e éd., Masson, Paris, 1926, p. 758.

2. C. ACHARD, *Troubles des échanges nutritifs*. Masson, Paris, 1926, t. 1, p. 369.

C'est seulement à la dose quotidienne de 10 grammes que HARKENSTEIN a pu constater une augmentation. En injection intraveineuse (ACHARD) (1), l'hypophosphite de Ca, au bout de dix minutes, cesse de produire l'augmentation du Ca du sang : avec les chlorure, formiate, lactate, l'augmentation n'est plus sensible après une demi-heure.

« En cas de tendance à la diminution du Ca sanguin, c'est le squelette qui, pendant longtemps, fait les frais de la déminéralisation : après quoi le cerveau, puis les muscles, enfin les autres tissus se déminéralisent progressivement.

« De nombreux auteurs ont recherché les variations de la teneur en Ca du sang dans un certain nombre d'états pathologiques : les résultats obtenus ne sont, en général, comparables que s'ils proviennent de l'application des mêmes méthodes ; en outre, ces méthodes doivent présenter une exactitude suffisante. C'est ainsi que LYMAN (2) a cherché par un procédé néphélométrique à déterminer la teneur en Ca du sang d'individus normaux et de divers malades. Etant donné que cet auteur obtient, dans le sang du sujet sain, des teneurs en Ca pour 100 variant de 0,0052 à 0,0096 et qu'il établit des moyennes entre des chiffres si éloignés, il paraît difficile de faire état de ses résultats.

« Dans les états pathologiques, on constate fréquemment que le taux du Ca reste normal ; cependant, on enregistre des variations parfois importantes ; ces variations se manifestent le plus souvent par une diminution, plus rarement par un relèvement du taux du Ca sanguin.

DIMINUTION DU TAUX DU Ca DU SANG.

« GLASER la constate chez le plus grand nombre de ses malades fébriles pendant la montée de la température.

« Dans l'urémie, l'hypocalcémie n'est pas constante, mais on la trouve dans la grande majorité des cas (TSCHIEMBER) (1). Cet auteur publie deux observations particulièrement intéressantes desquelles il résulte que le taux du Ca s'abaisse avec la progression de l'urémie et se relève graduellement à mesure que l'urémie s'amende.

1. Cl. TSCHIEMBER, *C. R. Soc. biol.*, 1924, t. 94, p. 195.

« Les variations constatées sont profondes. Le Ca sérique a oscillé chez un malade entre 0,008 et 0,0013 et chez un autre sujet entre 0,0046 et 0,0074 (ce dernier chiffre étant obtenu concurremment avec 3 gr. 72 d'urée par litre).

« Le même auteur a encore rencontré des diminutions fréquentes du Ca sanguin :

1^o Dans certains états cachectiques où elle atteint 40 p. 100, sans toutefois que cette hypocalcémie se rencontre dans tous les états cachectiques, KLOTZ ayant trouvé fréquemment des chiffres normaux chez les cancéreux cachectiques ;

2^o Dans certaines maladies infectieuses graves, telles que leucémie aiguë, fièvre typhoïde, streptococcémie, l'hypocalcémie constatée ne paraît pas être simplement la conséquence de la gravité de l'infection, LOOFT ayant observé une calcémie normale ou augmentée dans des formes très graves de tuberculose ;

3^o Enfin dans certains états diarrhéiques.

« HANSEN (1) a observé des diminutions du Ca sérique dans divers états pathologiques, notamment :

1^o Dans des cas de dénutrition chronique avec formation d'œdème (de 0,007 à 0,009 Ca p. 100) ;

2^o Dans la tétanie (de 0,0062 à 0,0068 p. 100), avec parfois aussi des chiffres normaux ;

3^o Dans quelques cas d'épilepsie ;

4^o Dans les syndromes asthéniques ou neurasthéniques caractérisés par une hyperexcitabilité du système neurovégétatif et dans l'hyperthyroïdie.

« Enfin, HALVERSON (2) enregistre des diminutions nettes du Ca du sang dans des cas d'ictère hémotogène, dans l'éclampsie, la pneumonie et particulièrement dans l'anémie.

AUGMENTATION DU TAUX DU Ca DU SANG.

« Elle ne se manifeste que rarement dans les états pathologiques et cette augmentation reste généralement peu importante. M^{lle} TSCHEMBER, effectuant un grand nombre de dosages sur le

1. W. JANSEN, *Deutsch. Arch. f. Klin. Med.*, t. 144, p. 14-18, 1924.

2. HALVERSON, MOHLER et BERGEIN, *Journ. of Biol. Chem.*, t. 32, p. 171, 1917

plasma par la méthode de HIRTH après avoir écarté les échantillons provenant de malades traités avec les sels de chaux, n'a rencontré que trois fois une augmentation un peu notable du Ca sanguin :

1 ^o Diagète grave	Ca pour 1.000 = 0.118
2 ^o Maladie de Vaquez	— = 0.112
3 ^o Tuberculose avancée	— = 0.112

« Aussi l'auteur déclare que « les faits sont trop peu nombreux et trop disparates pour pouvoir servir à une recherche des causes de cette augmentation de la calcémie ».

« M. P. WEILL, GUILLAUMIN et WEISMANN-NETTER (1) ont observé que les malades atteints d'hypertension artérielle sans athérome ne présentent pas en général d'augmentation du Ca sérique. Chez les athéromateux, au contraire, le Ca sérique est fréquemment élevé ; mais, même dans des formes très avancées, alors que les parois artérielles sont profondément infiltrées de sels calcaires le calcium et le magnésium du sérum se tiennent très fréquemment dans leur limite physiologique. La précipitation et l'incrustation de la chaux dans les parois vasculaires peuvent donc ne se manifester par aucune augmentation de la teneur du sang en Calcium.

« Dans le rhumatisme déformant, dont l'étiologie reste obscure, les dépôts anormaux de sels calcaires constituent un des traits caractéristiques de la maladie. Le métabolisme du Ca est-il affecté ? MARK (2) utilisant la méthode de CLARK, a constaté dans plusieurs cas de rhumatismes déformant une hypercalcémie remarquable avec des teneurs en Ca variant de 0,018 à 0,027 p. 100. Ces taux élevés ne furent pas plus modifiés par l'application d'un régime pauvre en chlorures que par l'administration d'acides, d'alcalis ou de salicylate de soude. L'institution d'un régime pauvre en Ca procure quelque bénéfice lors des premiers stades de la maladie ; mais, dans les cas avancés, il n'apporte aucune amélioration.

« WEILL et GUILLAUMIN (3) ont aussi observé fréquemment de l'hypercalcémie chez les malades atteints de rhumatisme chronique caractérisé par des raideurs et des ankyloses avec ou sans

1. M. P. WEILL, Ch. O. GUILLAUMIN et R. WEISMANN-NETTER, *C. R. Soc. Biol.*, t. 88, p. 732, 1923.

2. R. MARK, *Journ. of Metabolic Research*, t. 4, nos 1, 2, 1923.

3. T. MALAMUD et P. MAZZOCCO, *C. R. Soc. biol.*, t. 88, p. 396, 1923

déformation, quelle qu'en soit l'origine. Toutefois cette exagération qui d'ailleurs fait fréquemment défaut dans les formes légères, est inconstante, elle peut manquer totalement dans des cas où la radiographie décèle de grosses altérations osseuses avec formation d'exostoses importantes.

« Les glandes à sécrétion interne paraissent, nous le verrons plus loin, avoir une influence sur la minéralisation du sang ; en particulier, il semble que l'ovaire exerce une action sur le métabolisme du Ca. MALAMUD et MAZZOCCO (1) signalent, à la ménopause, une diminution du Ca du sang et une augmentation dans quelques cas de ménopause précoce. LEICHER (2) n'a observé aucune influence des glandes sexuelles sur le taux du Ca sanguin ; pourtant, dans un travail, il signale que la castration détermine son augmentation. A. BLANCHETIÈRE (3), vérifiant la teneur en Ca, Na et K après ovariectomie et à la ménopause, constate que dans la presque totalité des cas, les caractéristiques de ces deux états paraissent être augmentation du Ca, et diminution des métaux alcalins par rapport aux alcalino-terreux.

« Enfin, JANSEN constate que l'hypercalcémie est de règle dans les épanchements pleuraux ; le taux du Ca peut atteindre jusqu'à : 0,0155 p. 100. JACOLEWA (4) signale, dans un ordre d'idée analogue que dans toutes les maladies ayant comme conséquence de l'ascite ou de l'œdème le taux du Ca est augmenté ; il explique cette augmentation par la concentration plus grande du sang. Pour le même auteur, les intoxications par les sels de mercure s'accompagnent également d'hypercalcémie.

ETATS PATHOLOGIQUES OU LE TAUX DU CALCIUM RESTE NORMAL.

« Si comme on vient de le voir, le taux du calcium sanguin est susceptible de modifications au cours de quelques états pathologiques, il apparaît bien que, dans l'ensemble, les diverses maladies ne provoquent guère de variations. C'est ainsi que le calcium sanguin reste normal au cours de la plupart des maladies infectieuses (typhus, érysipèle, pyémie, septicémie, polyarthrite aiguë)

1. T. LEICHER, *Deut. Arch. Klin. Med.*, t. 110, p. 23, 85, 116, 1922.
2. A. BLANCHETIÈRE, *C. R. Soc. Biol.*, t. 92, p. 491, 1925.
3. A. BLANCHETIÈRE, *C. R. Soc. Biol.*, t. 92, p. 491, 1925.
4. A. JACOLEWA, *Russkaja Klinika*, t. 4, n° 16, p. 165, 1925.

et dans les maladies du métabolisme, comme la goutte ou la presque totalité des cas du diabète sucré (JANSEN).

« Dans l'hémophilie, le taux du calcium sanguin reste normal; en outre, l'introduction des sels de calcium dans la circulation n'exerce aucune action sur le mode de coagulation du sang (JACOLEWA).

« Chez les enfants rachitiques, le calcium sanguin ne présente aucune différence avec celui des enfants normaux; il paraît n'y avoir aucun rapport entre la gravité de l'affection et la proportion du calcium (1).

« Chez les tuberculeux, la teneur du sang en calcium oscille entre les limites normales; il semble pourtant que, dans la tuberculose pulmonaire progressive grave, le taux du calcium tende à se rapprocher de la limite inférieure (MATZ) (2).

QUELQUES FACTEURS SUSCEPTIBLES DE TROUBLER L'ÉLIMINATION DU CALCIUM PAR LES URINES.

« Nous avons indiqué que l'individu normal, soumis au régime type décrit plus haut, élimine chaque jour en moyenne par ses urines : 0 gr. 214 de calcium soit 0,0033 par kilo. Cette quantité est généralement inférieure à celle qui est contenue dans les fèces et plusieurs facteurs semblent susceptibles de modifier chez un même sujet le rapport qui existe entre le calcium urinaire et le calcium des fèces. Il paraît opportun de rappeler ces faits avant d'examiner les modifications du calcium urinaire et d'indiquer que les sujets doivent être soumis, pendant la durée de l'expérience, à un régime strictement identique.

« GRIMMÉ (3) rappelle que l'augmentation du Ca urinaire sous l'influence du travail intellectuel est constante. Le phénomène est très régulier et son graphique serait « presque superposable à celui de l'activité mentale ». Par contre, dans certains états psychiques (rémission consécutive à des troubles mentaux, surexcitation maniaque chronique avec nuance de clémence), il se produit une forte diminution du Ca urinaire.

1. GRACE H. ANDERSON, *British Journ. of Children's Diseases*, avril, juin 1924.

2. P. B. MATS, *Amer. Rev. of Tuberc.*, t. 11, n° 3, p. 250, 1925.

3. GRIMMÉ, thèse doct. ès sc., p. 36, Fribourg, 1906.

« L'élimination de la chaux par le rein malade a fait l'objet d'un intéressant travail de HETENYI et NOGRADI (1). Les auteurs ont recherché la teneur en Ca de l'urine après injection intraveineuse de 10 cm³ de solution de CaCl² à 10 p. 100, en employant la méthode suivante : le sujet, qui urine avant l'expérience, ne prend pendant une heure ni liquide, ni aliments. Une sonde est introduite dans la vessie, puis l'injection de CaCl² est pratiquée l'urine qui s'écoule est prélevée dans des récipients isolés qui sont changés après 5, 10, 15, 20, 45, et 60 minutes. La sonde est alors enlevée. Le sujet reste encore pendant deux heures sans prendre ni liquide, ni aliments, après quoi on prélève de nouveau de l'urine. Les dosages furent pratiqués d'après la méthode de WAARD.

« Les auteurs purent ainsi déterminer trois modes d'élimination du Ca :

1° Le calcium de l'urine augmente d'une façon continue et atteint son maximum de 30 à 40 minutes après l'injection intraveineuse, ce maximum représentant environ 400 pour 100 du Ca contenu habituellement dans l'urine. Quelques heures après, tout le Ca injecté est éliminé. C'est le mode normal ; on l'observe également chez les tuberculeux (DALLEZ) (2).

2° Le calcium urinaire augmente un peu, il n'atteint qu'après deux heures son maximum qui correspond à un accroissement de 100 p. 100 : cette forme se rencontre au cours de la convalescence des néphrites aiguës.

3° L'élimination reste fixe et n'est en rien influencée par l'introduction des sels calciques par la voie intraveineuse : ce résultat a été observé dans plusieurs cas de néphrosclérose maligne. »

Dosage du calcium.

Il existe plusieurs procédés permettant de doser d'une façon précise le calcium dans une solution ne renfermant que cet élément mais, on a, par contre, fort peu de choix aussitôt qu'il s'agit de faire ce dosage dans une solution complexe comme celle que l'on obtient par la désagrégation d'un organe animal, et où le calcium est accompagné de Fe, Mg, PO⁴H³ et des alcalins.

1. G. HETENYI et V. NOGRADI, *Klin. Woche.*, t. 4, n° 27, p. 1300, 1925.
2. J. DALLEZ, *Bioch. Zeitsch.*, t. 171, p. 146, 1926.

La seule méthode que l'on s'accorde à recommander dans l'analyse d'une pareille solution consiste dans la séparation du Calcium à l'état d'oxalate insoluble en milieu ammoniacal, neutre ou acétique. Ce procédé est cependant loin d'être parfait, ainsi qu'en témoignent les nombreux travaux qu'il a suscités et la diversité des techniques proposées. La minutie de ces techniques a pour but : 1^o de placer l'opération dans des conditions qui diminuent autant que possible l'importance des causes d'erreur dont la plus grave est l'entraînement d'oxalate de magnésium par l'oxalate de calcium ; 2^o de donner naissance à un précipité filtrable, l'oxalate de calcium se présentant en cristaux excessivement ténus si les conditions ne sont pas favorables.

Les techniques recommandées sont pour les microdosages, celle de TREADWELL (1) de DENIGES (2) de FRÉSÉNIUS (3) de GRIMME (4).

Pour les microdosages nous avons des techniques dues à WRIGHT (5), HAMBURGER (6), MARRIOTT et HOWLAND (7), KRAMER et TISDALL (8). LYMAN a dressé un procédé de dosage rapide (9) par néphélémétrie qui ne donne pas de bons résultats, même entre ses mains. HIRTH (10) s'inspirant d'une technique de JANSEN (11) a dressé une technique, à partir de 5a de sang qui ne donne lieu à aucune critique (12) et permet d'obtenir des résultats comparables aux chiffres résultant du microdosage.

Voici le principe de la méthode que nous adoptons pour notre technique (13).

5 cm³ de plasma sont calcinés dans une capsule de platine. On

1. TREADWELL, *Chimie analyt.*, trad. N. BOLL, 3^e éd. f^o, t. 2, p. 78. Dunod, 1920.

2. DENIGES, *Précis Chimie anal.*, 4^e édition.

3. FRÉSÉNIUS, *Anal. Ch. Quant.*, trad. L. GAUTIER, 8^e éd. Masson.

4. GRIMMÉ, *Dosage du Ca en physiologie*, th. doct. Sc. de Fribourg, 1906.

5. WRIGHT, *The Lancet*, 6 décembre 1906 et 14 octobre 1905.

6. HAMBURGER, *Zeitsch. Phys. Chem.*, t. 69, p. 633, 1909.

7. MARRIOTT et HOWLAND, *Journ. of B. Ch.*, t. 32, p. 233, 1917.

8. KRAMER et TISDALL, *Journ. of Ch. Biol.*, t. 48, p. 223, 1921.

9. LYMAN, *Journ. of Ch. Biol.*, t. 29, p. 169, 1917.

10. HIRTH, *C. R. Soc. Biol.*, t. 88, p. 460, 1923.

11. JANSEN, *Zeitsch. Phys. Ch.*, t. 101, p. 476, 1918.

12. HIRTZ et KLOTZ, *C. R. Soc. Biol.*, t. 88, p. 1153.

13. Nous avons étudié également le dosage opacimétrique du calcium à l'état de tungstate de chaux. Une étude et une méthode intéressante basées sur ce principe ont été publiées récemment par M. BOUSSERON et M^{lle} BOUIS-SOU. *Bull. Soc. de Chim. Biol.*, t. XII, 1930, p. 482.

dissout le résidu dans 2 cm³ HCl à 7 p. 100. On ajoute 4 gouttes de FeCl³ à 4 p. 100, plus une goutte d'eau de Brome. On fait bouillir, on dilue à 15 cm³ on ajoute une goutte de phénolphtaléine, puis de l'ammoniaque jusqu'à virage, on neutralise par l'acide acétique et on acidifie par 5 gouttes acide acétique à 50 %. On porte à l'ébullition et on filtre de façon à séparer le phosphate et l'acétate basique de fer.

On précipite le calcium par l'acide oxalique à l'ébullition, on ajoute de l'ammoniaque pendant le refroidissement, puis de l'oxalate d'ammonium.

TECHNIQUE DU DOSAGE PAR PRÉCIPITATION ET OPACIMÉTRIE.

Après avoir établi notre technique et le rythme de précipitation de l'élément à doser, à partir d'une solution et un sel de calcium pur, nous étudierons les moyens d'extraire le calcium des milieux biologiques pour le précipiter par notre technique type.

Précipitation du calcium d'une solution pure de ses sels.

A. — Préparation d'une solution titrée de chlorure de calcium à 1 pour 100 en Ca.

Le chlorure de calcium pouvant difficilement être pesé pur et sec, je le prépare par double décomposition entre le carbonate de chaux pur et l'acide chlorhydrique pur.

B. — Préparation d'une solution titrée de sel de calcium à 1 % en calcium contenant du fer, du magnésium, du phosphate de Na dans les proportions voisines de celles rencontrées dans le sang.

Des quantités croissantes de calcium de 0 mmgr. 1 à 2 mmgr. sont disposées dans des tubes à essai jaugés à 15 cm³. Ils sont soumis à la technique de HIRTH.

MÉTHODE DE PRÉCIPITATION DU CALCIUM A L'ÉTAT D'OXALATE SELON HIRTH.

Réactifs. — 1^o HCl à 4 pour cent.

2^o H²O bi-distillée.

3^o Sol. de FeCl 3 à 4 pour cent.

- 4° Eau de brome.
 5° Sol. de phénolphtaléine à 1 pour cent.
 6° Acide acétique à 50 pour cent.
 7° Liquide oxalique + HCl, dissoudre 3 gr. d'acide oxalique dans 50 cm³ d'HCl $\frac{n}{1}$ et compléter à 500 avec H²O bi distillée.
 8° Sol. saturée d'oxalate d'ammoniaque.

TECHNIQUE POUR LA PRÉCIPITATION DE L'OXALATE DE CHAUX
 EN VUE DE SON DOSAGE OPACIMÉTRIQUE.

Après avoir essayé un certain nombre de techniques inspirées de HIRTH, nous avons suivi celle-ci.

Dans chaque tube à essai contenant une certaine quantité de calcium, depuis 0 mmgr. 1 jusqu'à 2 mmgr. on verse goutte à goutte de la solution d'ammoniaque pure jusqu'à neutralisation. On met une goutte d'acide acétique (1) puis 4 cm³ de glycérine destinée à donner de la viscosité. On met alors 1 cm³ de liquide oxalique et on plonge au bain-marie (bouillant à gros bouillons). On laisse 10 minutes exactement. Ces précautions étant nécessaires pour le rythme de cristallisation.

On met alors 2 cm³ de la solution d'oxalate d'ammoniaque et on laisse encore 5 minutes au bain-marie.

On neutralise à ce moment par de la solution d'ammoniaque mise goutte à goutte. On laisse encore 5 minutes au bain-marie.

On refroidit brusquement sous un courant d'eau et on complète à 10 cm³ avec de l'eau distillée.

On mesure alors la densité optique.

Nous avons obtenu pour plusieurs séries de dosages les chiffres d'absorption suivants lus au photomètre VERNES, BRICQ, YVON.

Concentration	Densité optique pour 5 dosages							
2 mm.	260	—	265	—	260	—	255	— 255
1 mm. 50	210	—	200	—	190	—	200	— 190
1 mm.	160	—	155	—	165	—	160	— 160
0 mm. 75	120	—	125	—	120	—	125	— 120
0 mm. 50	90	—	85	—	80	—	80	— 85
0 mm. 25	50	—	40	—	40	—	45	— 50

1. La condition optima serait d'avoir un P_H, de 5 environ.

La courbe obtenue avec ces chiffres est assez incurvée. Notons qu'elle diffère des mesures de calcium faites directement dans le sérum sanguin sans défécation ni purification par MM. VERNES et

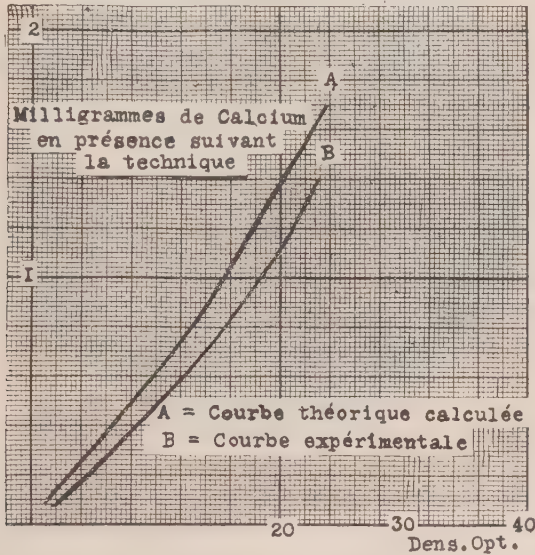


Fig. 35. — Courbe de dosage opacimétrique du calcium à l'état d'oxalate de chaux, au moyen du photomètre VERNES, BRICQ, YVON.

BRICQ. Les résultats qu'ils ont obtenus (1) donnent une droite, résultat non satisfaisant pour les lois optiques et les rythmes de cristallisation eux-mêmes, les grains cristallins n'étant pas identiques aux diverses concentrations.

NUMÉRATION DES GRAINS CRISTALLINS A DIVERSES CONCENTRATIONS

Courbe de numération.

Dans le but de vérifier si le nombre des grains est fonction des concentrations et de tracer une courbe représentative, qui devra avoir la même forme que la courbe d'absorption, nous avons compté au microscope les grains à diverses concentrations au moyen de la cellule de NAGEOTTE, selon la technique de M. J. PERRIN (2).

1. Fascicule VERNES chez MALOINE.
2. J. PERRIN, *Les atomes*.

La courbe obtenue est superposable à la courbe d'absorption.

Nous avons également vérifié les numérations par des microphotographies sur cellule à fond quadrillé de dimensions connues. Nous en reproduisons quelques-unes ici.

Notons qu'il est possible de déterminer l'absorption et de tracer la courbe en connaissant le nombre de grains et utilisant la formule de CHÉNEVEAU et AUDUBERT :

$$I - \frac{I}{I_0} = e - \frac{KNd}{dn}$$

question étudiée précédemment.

Cependant une telle énumération et la connaissance des autres facteurs présente un soin et des difficultés qui s'ajoutent à la précipitation délicate de l'oxalate. BLAIR BELLE en 1907 (1) l'a employé et expérimenté sans avantage de précision ni de rapidité.

MICRODOSAGE DU CALCIUM A PARTIR DU SÉRUM SANGUIN.

Nous suivons la technique de HIRTH : calcination, élimination du fer et des phosphates, précipitation de l'oxalate de chaux.

Technique. — Si on s'adresse au plasma (ce qui est préférable à cause du rôle des sels de Ca dans la coagulation) on devra recueillir le sang par ponction veineuse dans un tube de centrifugeuse paraffiné et refroidi, puis centrifuger, on mesure 5 cm³ de plasma ou sérum qu'on évapore au B. M. dans une capsule de platine. Le résidu est incinéré avec précaution tant qu'il se dégage des fumées et ensuite plus énergiquement, on ne doit cesser la calcination que quand les cendres sont blanches.

On les dissout dans 2 cm³ d'HCl à 4 pour cent, on rince la capsule à l'eau bi-distillée et on ajoute les eaux de lavage à la solution.

Quand le rinçage est terminé, le volume total est environ 15 cm³.

Le verre est mis sur B. M., on verse 5 gouttes de la solution de FeCl₃, 1 goutte d'eau de brome ou de NO³H pour péroxyder le fer, on laisse 1 h. au B. M. La solution étant refroidie, on ajoute H²O bi-distillée presque à un volume de 15 cm³ et 1 goutte phénolphthaleïne on alcalinise par NH³, on neutralise par acide acétique dont on met un excès de 5 gouttes, on fait bouillir pour rassembler le

1. BLAIR BELL, *Bib. Med. Journ.*, 24 avril 1907.



Fig. 36 et 37. — Deux microphotographies de petits cristaux d'oxalate de calcium à deux concentrations différentes et en cellule quadrillée.

précipité de phosphate ferrique et d'acétate basique de fer et on filtre sur un petit filtre.

Le filtrat est recueilli dans une capsule ou un vase à précipité, on rince le verre et le filtre à l'eau bi-distillée renfermant de l'acétate d' NH^3 (6 gouttes NH^3 et acide acétique pour neutraliser). Le contenu de la capsule ou du vase à précipiter est évaporé à 15° , on ajoute 1 cm^3 de liquide oxalique, puis 4 cm^3 de glycérine ; on plonge au bain-marie 10 minutes. On met 2 cm^3 de solution d'oxalate d'ammoniaque, puis on laisse 5 minutes au bain-marie. On neutralise par l'ammoniaque, on laisse cinq minutes au bain-marie. On refroidit brusquement et on complète à 10 cm^3 avec de l'eau distillée.

On mesure alors l'opacité et on se reporte à la courbe.

CONCLUSION.

Cette étude du dosage du calcium contient des remarques intéressantes sur le rythme de précipitation de l'oxalate de chaux. La courbe d'absorption est proportionnelle à la concentration en calcium. La technique facile à réaliser permet au biologiste clinicien une estimation du calcium ; elle lui permet de suivre le métabolisme du calcium chez un malade avec facilité.

II

HUITIÈME DOSAGE

DOSAGE ET MICRODOSAGE NÉPHÉLÉ MÉTRIQUES DE L'URÉE DANS L'EAU, L'URINE, LE LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN ET LE SANG

L'importance et la fréquence du dosage de l'urée dans l'urine le sang et le liquide céphalo-rachidien, d'une part, d'autre part l'existence d'une réaction spécifique de l'urée (précipitation par le xanthidrol), particulièrement favorable aux appréciations néphé-

lémétriques, nous ont conduits à préciser une technique de dosage de l'urée par le photomètre VERNES, BRICQ, YVON.

Principe. — L'urée est précipitée par le xanthydrol à l'état de dixanthylurée, selon la technique de FOSSE (1) modifiée aux fins d'application du photomètre.

CONDITIONS DE PRÉCIPITATION DE L'URÉE DANS UNE SOLUTION D'URÉE. FORMES DES CRISTAUX.

Nous rappellerons les conditions de précipitations de l'urée telles que FOSSE les a données, de plus nous signalerons les diverses formes cristallines de l'urée aux diverses concentrations, fait capital pour nous : la forme du grain changeant il devra en résulter une absorption non représentable par une droite.

CONDITIONS DE LA CONDENSATION AVEC L'URÉE.

Une solution alcoolique alcaline de l'urée ne donne rien.

On ne peut employer les acides minéraux qui provoquent une altération rapide de xanthydrol et ont une action destructrice sur l'urée et l'urée.

L'acide acétique ne détruit pas, *dans les conditions* des expériences des dosages, l'urée et l'urée.

Celle-ci peut subir cependant l'hydrolyse par l'acide acétique mais d'une manière lente et *limitée surtout à la température ordinaire et d'un excès de xanthydrol.*

L'acide acétique dissout les produits de décomposition et la condensation est beaucoup plus rapide que la décomposition.

PRÉCIPITATION RAPIDE DE L'URÉE À L'ÉTAT AMORPHE.

Dans une solution concentrée de xanthydrol dans l'acide acétique cristallisable, si on introduit de l'urée ou de l'urine un précipité d'urée apparaît immédiatement. La condensation paraît instantanée comme une réaction de chimie minérale. La réaction ainsi est vite faite, mais *l'urée ainsi formée est impure*, elle englobe des parcelles de xanthydrol que des lavages même prolongés n'enlèvent ; *elle ne paraît pas cristallisée*, même au plus fort grossissement du microscope ; elle est très fine et traverse les filtres.

PRÉCIPITATION A L'ÉTAT CRISTALLISÉ.

Le précipité se dépose cristallisé et presque pur à l'analyse, si l'on provoque la condensation moins précipitamment dans un milieu de plus grande dilution.

De plus, dans ces conditions, les produits moins solubles, provenant de l'altération du xanthidrol, le xanthane et le xanthone demeurent en solution.

Si l'acide acétique employé contenait des traces d'acides minéraux, elle se colorerait en rouge (sous l'influence de l'oxyde de xanthyle).

SUBSTANCES A ÉLIMINER DE LA SOLUTION D'URÉE (1) AVANT D'OPÉRER LA PRÉCIPITATION.

« 1^o Acides à neutraliser par NaOH : $\text{HI} \text{ — } \text{HCl} \text{ — } \text{HBr}$
— SO^4H^2 NO^3H $\text{PO}^4\text{H}^3, \text{PO}^3\text{H}^3$.

2^o Substances à transformer :

Sels de Pt, d'or, de Cu ; de Hg ; sels de fer, de zinc, de Cd.

3^o Substances à éliminer ou à détruire.

Halogènes.

Phalogènes, acide ClOH , BrOH et leurs sels $\frac{\text{H}^2\text{O}}{\text{H}^2\text{S}}$ et peroxydes.

Thiourée, phénylthéourée, phénylurée.

Diméthylaniline.

Pyrrol-indol scatol.

L'alcool bouillant permet d'extraire des traces d'urée mêlées à des quantités de matières étrangères.

INFLUENCE DE CERTAINS PRODUITS SUR LA CONDENSATION.

Ammoniaque, gêne la combinaison, de même :

Bases alcalines.

Corps minéraux ou organiques.

Le xanthidrol ne donne rien avec :

1^o Matériaux de l'urine humaine et du sérum sanguin autre que l'urée.

2^o Albumine de l'œuf et du sang : gélatine, fibroïne, peptone de

WITTE.

1. Extrait de Fosse, *loc. cit.*

3° Glycérine, lévulose, saccharose.

4° NO^3H .

5° Granidine, créatine.

6° Glycocolle et acide urique, tryptophane, acide hippurique.

7° Acide formique, butyrique.

8° Acides alcools.

9° Acides bibasiques.

Le xanthhydrol est précipité par l'Indol, le scatol.

Formes cristallines de la dixantylurée aux diverses concentrations en urée.

1° PRÉCIPITATION DE L'URÉE A PLUS DE 1 POUR CENT PAR LITRE.

Solution d'urée.....	1 cmc.	(0 gr. 001 mmgr. et
Acide acétique cristallisé....	0,50	plus)
Solution de xanthhydrol 1/10.	0,50	
	<u>5,00</u>	

A) Liqueur avec 5 gr. d'urée par litre introduit en une seule fois le xanthhydrol.

Aiguilles groupées parallèles en faisceau, en pinceaux ou en gerbes.

B) Même solution mais on introduit le xanthhydrol en plusieurs fois. On a des filaments cristallins plus larges et bien parallèles entre eux.

C) Si à la même solution (5 gr. par litre) on ajoute 1 dose insuffisante de xanthhydrol, on a de larges filaments.

SOLUTION A 1 GRAMME D'URÉE PAR LITRE.

Solution.....	1 cm ³	(0 gr. 005)
Acide acétique.....	3,50	
Solution de xanthhydrol 1/10 .	0,50	
	<u>5,00</u>	

Filaments plus ou moins parallèles.

Cas d'une solution à 0 gr. 50 par litre.

Solution.....	1 cm ³	(0,0005 d'urée)
Acide acétique.....	3,50	
Solution de xanthhydrol	0,50	
	<u>5,00</u>	

On a de petits cristaux en larges filaments et tables avec inclusions de petits filaments.

D) solution à 0,25 par litre.

Même aspect.

Pour ces concentrations mettre moins d'acide acétique et de xanthydrol.

E) Solution de 0,05 par litre à 1 gr. par litre.

Solution d'urée	1 cm ³
Acide acétique.....	2 cm ³
Solution de xanthydrol 1/10.	0 cm ³ 15

APPLICATION DE LA MÉTHODE A DES SOLUTIONS DE DIVERSES CONCENTRATIONS.

Cas d'une liqueur à 1 gr. d'urée par litre.

Solution d'urée.....	1 cm ³ (0 gr. 001)
Acide acétique.....	2 cm ³
Solution de xanthydrol 1/10.	0 cm ³ 15

Le xanthydrol est ajouté d'un coup ou par petites portions.

Cas d'une solution à 0,50 par litre (0,0005 en près).

Filaments groupés en rameaux et autour d'un point (fig. 1).

Cas d'une solution à 0,10 par litre (0,0001).

Petites agglomérations de filaments.

Cas d'une solution à 0,05 par litre.

Solution d'urée	1 cm ³ (0 gr. 0005)
Acide acétique.....	2 cm ³
Solution de xanthydrol....	0 cm ³ 15

C'est la limite de précipitation de l'urée dans les conditions de l'expérience, à de plus faibles concentrations d'urée il faut moins d'acide acétique.

CONCENTRATIONS INFÉRIEURES A 0 gr. 05 PAR LITRE.

Concentration de 1 egr. par litre.

Technique.

Solution d'urée à 1 egr.	10 cm ³
Acide acétique.....	10 cm ³
Solution de xanthydrol 1/10.	0 cm ³ 80

Précipitation de l'urée à 1 egr. par litre.

Après une heure de condensation on a des cristaux en petites aiguilles recourbées groupées autour d'un point.

En résumé pour la formule suivante :

Solution d'urée.....	1 cm ³
Acide acétique.....	2 cm ³
Solution de xanthidrol 1/10.	0 cm ³ 15

Pour 1 cgr. pl. (0 gr. 001 en présence)	} <i>filaments en gerbes,</i> <i>pinceaux.</i>
0,50 (0 gr. 005)	
0,10	
0,05	

Pour les concentrations inférieures à 0,05 par litre.

Pour 0,01 par litre.

Solution	10 cm ³
Acide acétique.....	10 cm ³
Solution de xanthidrol	0 cm ³ 80

on a des *aiguilles recourbées*.

Suivant concentration et milieu on peut modifier les critaux; ainsi pour 0 gr. 50 d'urée par litre on a des tables avec la formule :

Solution à 0 gr. 50	1 cm ³
Acide acétique.....	3 cm ³ 5
Solution de xanthidrol 1/10.	0 cm ³ 50

et des *filaments* avec la formule .

Solution de 0 gr. 50.....	1 cm ³
Acide acétique	2 cm ³
Solution de xanthidrol 1/10.	0 cm ³ 15 »

CONSTRUCTION DE LA COURBE.

Les limites de l'appareil de VERNES, nous ont permis d'étalonner notre courbe entre les concentrations limites suivantes :

0 gr. 01 à 3 grammes d'urée par litre.

Des solutions d'urée dans de l'eau bi-distillée à $P_H = 7$ de concentration croissante ont été faites. La technique suivante a été adoptée pour précipiter la dixanthylurée :

Solution d'urée.....	0 cm ³ 50
Acide acétique cristallisable	1 cm ³ 70
Solution méthylique de xanthydrol	
au 1/10.....	0 cm ³ 30

Agiter, abandonner 5 minutes en contact, et ainsi de suite, pendant 15 minutes.

Au bout de 20 minutes : pour les fortes concentrations, on dilue au 1/10 le flocculum dans le milieu suspenseur indiqué ou dilué au $\frac{1}{2}$ avec ce même milieu.

La densité optique totale du milieu est lue au photomètre, on lui retranche la densité optique du milieu suspenseur.

INFLUENCE DES DIFFÉRENTS FACTEURS SUR LA PRÉCIPITATION.

I. *Lumière.* — Pratiquement la lumière est sans action sur la précipitation.

II. *Température.* — Une élévation de température hâte légèrement la précipitation mais pratiquement il suffit d'opérer à la température du laboratoire.

III. *Temps.* — Le temps intervient comme un facteur particulièrement intéressant. En effet, quelle que soit la concentration, la précipitation est presque totale en 20 minutes. Des lectures faites après une heure et 24 heures, ont donné pour la différence des densités optiques des chiffres de l'ordre de 4/100 en moyenne.

Nous résumons dans le tableau ci-dessous quelques-unes de nos vérifications :

Concentration initiale de la solution d'urée	20 minutes	Densité optique 1 heure	24 heures
0 gr. 5	90	90	98
1 gr.	145	1.150	153
1 gr. 50	195	195	200
2 gr.	232	235	240
2 gr. 5	260	265	268
3 gr.	285	290	290

L'insignifiance des différences entre 20 minutes et 24 heures nous a conduits à effectuer toutes les lectures au bout de 20 minutes.

Il faut remarquer l'extrême stabilité du précipité sous sa forme initiale de précipitation, comparativement au phénomène inverse noté pour les chlorures.

Nous indiquerons que dans le cas d'un milieu suspenseur simplement aqueux, c'est-à-dire d'une solution d'urée comme celles qui servent à étalonner la courbe, un dépôt se produit au bout de 3 ou 4 heures, mais qu'une simple agitation suffit à resuspendre le flocculum et à retrouver pour le milieu la même densité optique.

IV. *Corps étranger.* — L'introduction d'un corps étranger amorce la floculation. C'est ainsi que la simple introduction d'un fin agitateur de verre hâte l'apparition du phénomène. NICLOUX et WELTER l'avaient déjà signalé.

V. *Excès de précipitant.* — Nous opérons toujours avec un excès de solution méthylique de xanthidrol frais, selon les indications formelles de FOSSE, ROBYN François et NICLOUX et WELTER. La précipitation est d'autant plus rapide et totale que la solution est plus récente. Nous recommandons donc de faire des solutions dans l'alcool méthylique par petites quantités à la fois; et pour éviter toute erreur qui aurait pour cause une transformation chimique du xanthidrol, il importe de ne pas les conserver au laboratoire un temps supérieur à 15 jours.

VI. *Contrôle de la courbe.* — Divers contrôles ont été effectués :

1^o Etalonnage par une série de lectures faites avec différentes solutions de même concentration. Les moyennes ont été prises pour fixer les abscisses de la courbe.

2^o Appliquant exactement la technique préconisée par M. Charles AUGUSTE, une seconde courbe a été construite sur laquelle nous avons pu remarquer que pour une ordonnée déterminée, l'abscisse était proportionnelle à l'abscisse correspondant à la même ordonnée sur notre première courbe, et que le facteur de proportionnalité était *constant* et aux erreurs d'expérience près égal à $1/5$.

Ce facteur est donc précisément égal au rapport des masses d'urée employées dans les deux cas : 0 gr. 01 et 0 gr. 05.

Nous avons d'ailleurs repris la méthode de M. Ch. AUGUSTE, mais en diluant le flocculum au $1/2$ et non plus au $1/10$ comme nous l'avions fait dans l'étalonnage de notre courbe. Et, nous avons pu remarquer que la courbe construite dans ce cas est, aux erreurs d'expérience près (4 à $5/100$ D. O.) superposable à notre courbe d'étalonnage.

De plus, ces différentes vérifications nous conduisant à des courbes superposables, nous ont démontré par là même la reproductibilité du phénomène suivant la même loi, confirmant notre droit d'étalonner le photomètre en concentration d'urée, au moyen de la courbe que nous avons établie.

3^e En possession de ces résultats, l'urée d'un sérum sanguin a été dosée par volumétrie (méthode à l'hypobromite de soude dans l'uréomètre de DOUBAIS), gravimétrie et néphélémétrie, selon la technique de Ch. AUGUSTE, avec dilution du floeculum au 1/2.

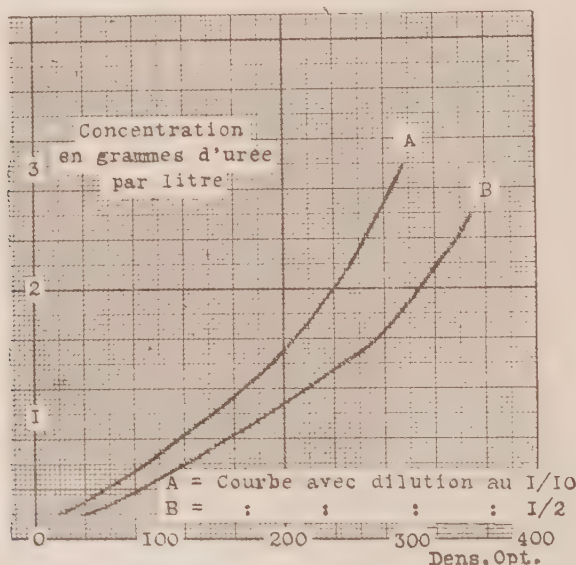


Fig. 38. — Courbe de dosage opacimétrique de l'Urée au moyen du photomètre VERNES, BRICQ, YVON.

Nous avons entrepris des défécations par des réactifs différents. Tout d'abord le réactif de TANRET de formule :

HgCl ²	1,55
KI	3 gr. 60
CH ³ CO ² H crist.	20 emc.
H ² O dist.	80 cm ³

a été utilisé, puis tenant compte de la remarque de Ch. AUGUSTE (1)

1. AUGUSTE (Ch.), *C. R. Soc. Biol.*, 20 juillet 1925, p. 639.

sur ce fait que la présence de NaCl, KCl, NaF, décomposent le xanthydrol à l'état de xanthome qui précipite, introduisant ainsi une erreur par excès, nous avons employé le défécant indiqué par Ch. AUGUSTE et recommandé par DOURIS (1) :

Acétate de chaux	1 gr.
HgCl ²	2 gr. 71
KI.....	7 gr. 20
CH ³ CO ² H.....	66 cm ³ 66
H ² O	q. s.pour 100 cm ³

la défécation se faisant à parties égales.

Historique de la précipitation dans les milieux biologiques.

MM. Charles et S. AUGUSTE principalement ont étudié la néphélémétrie de l'urée (2). Ils remarquèrent qu'il était possible d'obtenir un flocculum stable, sans agglomération des cristaux de dixanthylurée, ni précipitation, à partir d'un sérum non déféqué.

D'après eux, la stabilité de la suspension serait due aux albumines colloïdales du milieu.

Pour éviter la précipitation des albumines qui fausserait la lecture néphélémétrique, ils ont proposé l'emploi de l'acide acétique à 54 % .

Les proportions de réactifs employés et préconisés par ces auteurs sont :

Sérum sanguin	0 cm ³ 10
Solution d'acide acétique à 54 %..	2 cm ³ 30
Solution méthylique de xanthydrol à	
1 pour 10	0 cm ³ 10

Mais contrairement aux hypothèses faites, nous avons pu mettre en évidence à l'examen microscopique, la présence d'un léger précipité albumineux autour des cristaux de dixanthylurée, dont nous avons pu faire la microphotographie.

1. *Analyse du sang (Traité)*.

2. *Ann. I. P.*, t. XXX, p. 12. *C. R. Soc. de Biol.*, 1923, t. XXXIX, p. 994, et 1926, t. 2, p. 619.

Ce précipité se présente sous la forme de filaments fibrineux enserrant les cristaux de dixanthylurée.

Ce phénomène colloïdal n'apparaît qu'au cours de la formation de la dixanthylurée. Nous avons en effet étudié le mélange :

Sérum.....	0 cm ³ 10
CH ³ CO ² H à 54 %.....	2 cm ³ 3
Alcool méthylique.....	0 cm ³ 10

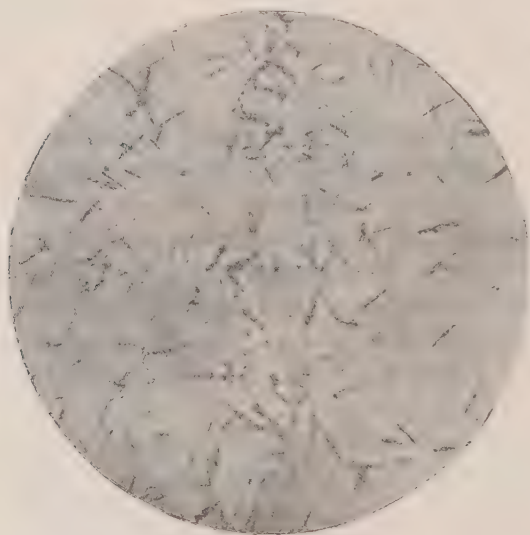


Fig. 39. — Flocculum de dixanthylurée entouré du réticulum albumineux.

Or, nous n'avons nullement observé de précipité albumineux dans ce cas.

L'origine du phénomène colloïdal secondaire albumineux semble donc bien résider dans la présence des cristaux de dixanthylurée eux-mêmes.

Au total donc on a pour l'opalescence mesurée une erreur par excès, mais comme nous le montrerons, erreur négligeable devant les très grands avantages de la technique de Ch. et S. AUGUSTE, quant à la rapidité et la stabilité du flocculum.

Dans leur publication de 1925, ils précisent l'inutilité de la défécation des milieux biologiques et opèrent en deux temps.

1^o Précipitation de l'urée par le xanthydrol.

2^o Dispersion pour l'obtention d'une suspension convenable pour les lectures néphélométriques.

C'est-à-dire, qu'ils ajoutent assez d'acide acétique pour que la concentration dépasse 90 %, en ayant soin d'introduire un fort excès de xanthydrol en solution acétique.

Dans ces conditions : lorsqu'on opère sur un sérum sanguin, les albumines qui précipitent légèrement au premier temps de l'opé-

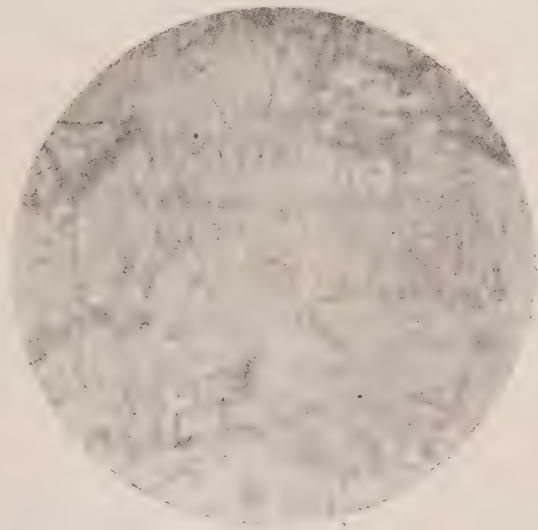


Fig. 40. — Flocculum de dixanthylurée après action du milieu suspenseur.

ration se redissolvent complètement au deuxième temps, à condition que la concentration acétique finale ne dépasse pas 95 % ».

Notre technique. — Dans le but de faire la part de l'erreur due au précipité albumineux observé nous avons opéré le dosage avec et sans défécation.

I. Dosage avec défécation. — Citons tout d'abord la technique de FOSSE lui-même :

« *Notre méthode* (Fosse) consiste à précipiter l'urée dans le sérum dépouillé à froid des protéines.

Elimination des albuminoïdes du sérum.

Il est possible de condenser l'urée et le xanthidrol directement au sein du sérum, dissous dans *qs* d'acide acétique ; mais l'urée dixanthylée ainsi formée est impure, elle englobe de petites quantités d'albumine que des lavages prolongés sont impuissants à lui enlever. L'analyse révèle encore que ce corps possède une teneur azotée notablement supérieure à la théone, si l'on opère sur le sérum imparfaitement désalbuminé, tel qu'il se présente par exemple après 1 heure de chauffage vers 70°, 80° avec son volume d'eau acidifiée à 1 % et sans addition de matière saline.

L'urée ne contient plus sensiblement d'albumine si l'on provoque sa formation dans du sérum préalablement par l'iodomereurate acétique de Tanret.

Nous avons utilisé cet excellent réactif en augmentant sa concentration afin de faciliter les manipulations et d'éviter de trop diluer le sérum.

Milieu de précipitation.

Eau	1 cm ³
Acide acétique crist.	2 cm ³
Sol. de xanthidrol au 1/10	$3 \times \frac{1}{20}$

R. de Tanret concentré.

HgCl ²	2 gr. 71
KI	7 gr. 2
Acide acétique crist.	66 cm ³ 6

Mode opératoire.

Sérum	10
R. de Tanret	10

Mélanger avec une baguette, centrifuger ou essorer ou filtrer .

On fait la précipitation avec :

Sérum au 1/2.	15 cm ³
Acide acétique.....	15 cm ³
Sol. méth. de xanthidrol.	1 cm ³ 5 le (1/20 du volume).

1 heure de condensation.

Pour le lait, il faut l'écrémer par centrifugation avant de mettre le réactif de Tanret. »

Influence de ce défécant sur le xanthhydrol.

D'après MM. MESTREZAT et M. Marthe Paul JANET, NICLOUX et WELTER, l'influence du défécant est nulle sur le xanthhydrol.

Technique de la précipitation.

Liquide biologique déféqué.....	1 cm ³
CH ³ CO ² H cristallisable.	1 cm ³ 20

Agiter et ajouter :

Solution de xanthhydrol au 1/10....	0 cm ³ 30
-------------------------------------	----------------------

Agiter et abandonner 20 minutes.

Technique de la lecture.

La densité optique de ce flocculum étant généralement trop forte, il est nécessaire de le diluer .

Nous avons adopté les proportions suivantes :

Flocculum	0 cm ³ 1
Milieu suspenseur.....	0 cm ³ 9

La formule du milieu suspenseur étant :

Acide acétique..	34 cm ³
Alcool méthylique	4 cm ³
H ² O distillée	36 cm ³

C'est-à-dire qu'on a eu recours aux constituants mêmes de la réaction à des proportions telles qu'il n'y ait ni altération du précipité, ni nouvelle précipitation.

II. Méthode sans défécation.

La technique est alors très simple.

Les proportions adoptées sont celles indiquées par M. Ch. AUGUSTE.

Sérum non. déféqué	0 cm ³ 10
CH ³ CO ² H à 54 pour cent	2 cm ³ 3
Solution méthylique de xanthhydrol à 1 pour 10	0 cm ³ 10

Agiter, abandonner pendant 20 minutes, le flocculum sera dilué ensuite à parties égales avec le milieu suspenseur de formule précédemment indiquée.

Les trois résultats sont concordants et se contrôlent aux erreurs d'expérience près.

Il convient cependant de remarquer que les chiffres trouvés par gravimétrie et néphélémétrie, sont toujours supérieurs au chiffre calculé par volumétrie.

Sensibilité de la méthode néphélémétrique dans le cas de l'urée.

Dans le cas de la technique Ch. AUGUSTE, nous opérons toujours sur des quantités d'urée inférieures à 0 gr. 0003 jusqu'à 0 gr. 000015.

Dans notre technique, nous opérons sur des quantités inférieures à 0 gr. 0015 jusqu'à 0 gr. 000075. Même à de telles doses la précipitation se fait bien. VERXUS a d'ailleurs déjà indiqué que des précipitations excellentes de solution d'urée à 1 pour 10.000 et même 1 pour 100.000, s'obtiennent avec le xanthidrol en 2 minutes.

Or, dans nos lectures photométriques, toutes dilutions requises étant faites, nous apprécions des densités optiques qui correspondent à des masses d'urée inférieures au 1/100.000 de gramme.

Des microdosages de l'urée par méthode pondérale ont été faits par NICLOUX et WELTER et portent sur des masses d'urée de 0 gr. 0004, 0 gr. 0002, 0 gr. 00005. De l'ensemble des travaux de NICLOUX et WELTER, il semble ressortir qu'il soit beaucoup plus facile d'évaluer ces masses infinitésimales par le moyen des densités optiques de leurs suspensions, que par voie pondérale directe.

La méthode générale de dosage néphélémétrique de l'urée a été appliquée par nous au dosage de l'urée dans :

- 1° L'urine ;
- 2° Le liquide céphalo-rachidien ;
- 3° Le sang.

I. — Dosage de l'urée dans l'urine.

L'urée dans l'urine humaine est toujours d'une concentration supérieure à 3 grammes par litre, d'où la nécessité de cette opération préalable, dilution au 1/10.

L'emploi de l'une ou l'autre méthode sans défécation ou par défécation, s'imposera selon les cas d'une urine non albumineuse ou faiblement albumineuse, et d'une urine très albumineuse.

1^o *Dosage sans défécation :*

Urine diluée au 1/10.....	0 cm ³ 10
Acide acétique à 50 pour cent.....	2 cm ³ 30

Agiter et ajouter :

Solution méthylque de xanthidrol.	0 cm ³ 10
-----------------------------------	----------------------

Agiter et abandonner 20 minutes en contact.

Prendre, après agitation :

Floculum.....	1 cm ³
---------------	-------------------

Le mettre dans un tube à hémolyse.

Ajouter :

Mélange suspenseur	1 cm ³
--------------------------	-------------------

dont la formule est la suivante :

Acide acétique pur	34 cm ³
Eau distillée.....	36 cm ³
Alcool méthylque.	4 cm ³

Agiter et verser dans la cuve VERNES, BRICQ, YVON.

Prendre la densité optique totale, et lui retrancher la densité optique du milieu suspenseur.

La densité optique vraie ainsi calculée servira à déterminer sur la courbe le chiffre correspondant de la concentration en urée, qui sera multiplié par 10, pour avoir la concentration de l'urine à analyser.

2^o *Dosage avec défécation.*

L'urine est déféquée par *parties égales*, au moyen du réactif indiqué par Ch. AUGUSTE et recommandé par DOURIS.

On filtre ou on centrifuge.

Puis on mesure exactement dans un tube à hémolyse :

Urine déféquée et diluée au 1/10...	1 cm ³
Acide acétique cristallisable.....	1 cm ³ 20

Agiter, et ajouter :

Solution de xanthidrol au 1/10....	0 cm ³ 30
------------------------------------	----------------------

Agiter, et abandonner 20 minutes.

Reprendre après une nouvelle agitation.

Floculum	0 cm ³ 10
Milieu suspenseur.....	0 cm ³ 90

Déterminer la densité optique vraie par différence entre la densité optique totale et la densité optique du milieu suspenseur. Se reporter à la courbe pour évaluation de la concentration en urée.

II. — Dosage de l'urée dans le sang et liquide céphalo-rachidien.

Dans tous les cas nous opérerons avec ou sans défécation, mais de préférence sans défécation dans le cas de microdosages où l'on dispose d'une quantité minima de liquide biologique.

La technique ne subit aucune modification et la lecture des densités optiques s'effectuera de façon analogue.

Une dilution préalable ici n'est en général pas nécessaire. Cependant, au cas où la densité optique serait supérieure à la limite supérieure des densités optiques sur notre courbe, il suffirait d'opérer une dilution convenable, généralement au 1/2 ou au 1/3, et dans ce dernier cas les chiffres indiqués par la courbe pour les concentrations seraient multipliés par 2 ou par 3.

III. — Titrage d'une solution aqueuse d'urée.

Solution d'urée.....	0 cm ³ 50
Acide acétique cristallisable	1 cm ³ 70
Solution méthylique de xanthidrol au 1/10.....	0 cm ³ 30

Calculer la densité optique vraie, comme on l'a indiqué précédemment et se reporter à la courbe pour obtenir le titre en durée de la solution étudiée.

Il va de soi que dans les cas qui sortent de la limite supérieure de la courbe, les dilutions requises pour y revenir seront simplement effectuées. On en tiendra compte par la suite dans la détermination de la concentration sur la courbe.

EXTRACTION DE L'URÉE DES MILIEUX BIOLOGIQUES
EN VUE DE SON DOSAGE OPTIQUE.

Cependant les résultats précédemment obtenus ne nous ont pas suffi et nous avons recherché une technique commode d'extraction de l'urée du sang en vue de son dosage.

Quelques techniques peuvent être employées que nous reproduisons ici pour mémoire, nous adopterons la technique de micro-analyse de MOINER et SJOQUIST utilisée par BANG.

1^o Techniques de séparation de l'urée.

Méthode de Schrader. — Cette méthode la plus anciennement connue basée sur la formation et la décomposition de la combinaison uréo-mercurique décrite par LIEBIG ; elle comporte les manipulations suivantes :

1^o Précipitation par l'alcool d'une partie des substances en solution.

2^o Evaporation du filtrat hydroalcoolique.

3^o Traitement du résidu dissous dans l'eau par le nitrate mercurique et la baryte.

4^o Décomposition du précipité par H^2S .

5^o Elimination du sulfure par filtration et de l' H^2S par un courant d'air.

6^o Neutralisation par la baryte de SO^3H venant du nitrate mercurique.

7^o Précipitation par CO^2 de la baryte en excès.

8^o Filtration, évaporation à sec dans les vides au-dessous de 70°.

9^o Epuisement du résidu par l'alcool absolu.

10^o Addition à la liqueur alcoolique de 3 fois son volume d'éther acétique.

11^o Filtration, évaporation.

12^o Application de ce traitement par l'alcool et l'éther acétique à l'extract sec 2 ou 3 fois.

13^o Si des cristaux d'urée n'apparaissent pas, on tente par addition au résidu de quelques gouttes de NO^3H , d'isoler son nitrate (qui ressemble d'ailleurs à l'azotate de potasse).

Méthode de Salkowski (Praktikum d. phys. u. pathol. Chemie, 1900). — 400 cm³ d'urine humaine sont additionnés d'un mélange

d'eau de baryte (2 vol.) et de solution saturée de nitrate de baryum (1 vol.) jusqu'à ce qu'il ne se produise plus de précipitation.

Le filtratum réuni aux eaux de lavage du précipité est évaporé à feu nu, puis au B.-M. dès que le volume atteint 200 cm³.

Après addition d'alcool (130 u.) au produit d'évaporation, filtration et concentration au B.-M le plus loin possible, on ajoute au résidu refroidi 2 fois son volume d'acide nitrique.

Le nitrate d'urée est recueilli le lendemain, lavé avec un peu d'acide nitrique à froid, puis séché par contact avec une matière poreuse (papier, porcelaine).

Après avoir complètement neutralisé la solution aqueuse de ce sel par addition à chaud de CO_3Ca , on decolore par le noir animal, filtre et évapore à sec.

L'urée est séparée du nitrate calcique par dissolution dans l'alcool, d'où elle cristallise après concentration.

Une 2^e cristallisation est nécessaire pour avoir le corps pur.

EXTRACTION DE L'URÉE DE L'URINE HUMAINE PAR LIPPICKS

(*Zeitschrift Chemie*, 1906, t. XL, p. 60).

L'urine est traitée d'abord par son volume de liqueur de MORNER-SJOQUIST (Solution saturée de NaCl^3 contenant en outre 5 % de NaOH) et ensuite par 20 volumes d'un mélange formé d'une partie d'éther et 2 parties d'alcool. Après 48 heures de contact, durant lesquelles on agite fréquemment, le liquide decante est saturé de gaz carbonique, filtré et évaporé à 40°.

Le résidu filtré dans le vide sulfurique pulvérisé, séché à nouveau est épuisé par l'alcool absolu : on filtre et on évapore la solution à 40° dans le vide.

L'extract séché dans le vide sulfurique pulvérisé et séché à nouveau est épuisé par de l'éther et de l'alcool absolu pris à volumes égaux.

Le nouvel extract sec et pulvérisé est épuisé par un solvant formé d'alcool éthylique et amylique.

L'alcool éthylique ayant été chassé, la solution amylique reçoit de l'acide oxalique anhydre, sublimé, en assez grand excès puis de l'éther (2 à 3 volumes) séché sur sodium et saturé d'acide oxalique anhydre.

Après 24 heures on traite par CO^3Ca , la solution aqueuse du dépôt formé d'oxalate d'urée et d'acide oxalique.

Dès que la réaction est devenue neutre, on filtre, on évapore à l'air, filtré à nouveau pour éliminer une petite quantité d'oxalate calcique qui se dépose au début de la concentration, puis, finalement, on évapore à sec.

On a de l'urée pure, prendre le point de fusion.

2^o TECHNIQUE DE SÉPARATION POUR LA MICROANALYSE SELON MORNER ET SJOQUIST ET BANG.

Le procédé est établi en s'appuyant sur les méthodes de dosage de l'urée de l'urine proposées par MORNER et SJOQUIST.

Pour séparer l'urée des autres composants du sang une extraction avec un mélange à parties égales d'alcool et d'éther s'est montrée la plus appropriée. La solubilité de l'urée dans ce mélange est faible mais suffisante pour le but qu'on se propose puisque 10 cm^3 peuvent dissoudre 132 mmgr. d'urée.

Les autres composants du sang, les acides aminés en particulier et les albumines sont entièrement insolubles ? Cependant, les phosphatides du sang passent en totalité dans la solution, mais ils sont de l'ordre de $\frac{1}{1000^e}$ de mgr.

Technique. — Quelque simple que puisse paraître le principe de ce dosage, l'exécution pratique exige la connaissance de certains détails et présente d'assez grosses difficultés. Le sang pesé est mis dans un verre sec ; pour l'exactitude du dosage, sa quantité ne doit pas dépasser 130 mmgr. On verse immédiatement dans le verre un mélange à parties égales d'alcool absolu et d'éther jusqu'à ce que le liquide dépasse la feuille imbibée de sang ou la goutte de sang de 1 cm.

On bouche le tube et on laisse l'extraction se faire. Cette extraction demande 20 heures, mais si on a pesé plus de 130 mmgr. de sang, l'extraction ne sera pas complète. L'extraction terminée, on verse l'alcool dans un cristalliseur pour évaporation ; on lave à l'alcool éther, on laisse évaporer puis on reprend l'urée par l'eau pour faire la précipitation, selon la technique donnée et on passe au photomètre.

Conclusion. — L'utilisation de la dixanthylurée pour la néphélémétrie photométrique, que nous avons préconisée est intéressante par la rapidité et l'exactitude du dosage de l'urée ; elle exige des précautions que nous avons mis en relief dès 1927 ; l'extraction de l'urée par l'alcool-éther selon BANG rapproche le dosage des conditions d'exactitude maximum.

Chapitre V

RÉSULTATS OBTENUS. COMPARAISON AVEC LES MÉTHODES VOLUMÉTRIQUES ET GRAVIMÉTRIQUES

Le dosage des chlorures pratiqué par opacimétrie selon notre procédé a donné les résultats suivants

	Erreur en plus ou en moins
Dosage dans l'eau.....	3 à 6 pour cent
Dosage dans l'urine (non albumineuse)	3 à 6 —
Dosage dans l'urine (albumineuse).....	5 à 6 —
Dosage dans le sang et le liquide rachidien.	6 à 8 —

Nous avons dit « erreur en plus ou en moins » de la teneur réelle : il se produit en effet souvent une légère surfloculation ou une modification dans la texture du précipité qui absorbe plus de lumière que normalement.

Les résultats obtenus dans le dosage des chlorures par la technique préconisée ici, sont égaux ou supérieurs à ceux de la méthode volumétrique, la technique est rapide et permet d'aller vite, surtout dans les nombreux dosages à faire en série. Elle mérite d'être utilisée par ceux qui possèdent les appareils nécessaires.

Le dosage de l'acétone donne les résultats suivants :

	Erreur maximum en plus ou en moins
Dosage dans l'eau.....	6 à 8 pour cent
Dosage dans l'urine.....	10 —

Ce dosage demande plus de soin que le précédent pour avoir de bons résultats, quoiqu'il est opéré sur un précipité pur en suspension dans un milieu défini. Il est rapide et d'une exécution facile. Il soutient entre des mains un peu entraînées la comparaison avec les méthodes volumétriques. Son principe et sa technique sont sans ambiguïté.

Le dosage de l'acide urique donne de bons résultats. Le principe et la technique de précipitation par l'hyposulfite cuivreux sont nettement définis. Les résultats obtenus sont :

	Erreur maximum en plus ou en moins	
Dosage dans l'eau	4	pour cent
Dosage dans l'urine	5 à 6	—
Dosage dans le sang	8	—

Les résultats sont comparables à ceux obtenus volumétriquement. Le dosage demande comme tous les dosages préconisés ici, les soins du microdosage.

Le dosage des sucres réducteurs donne les résultats suivants :

	Erreur maximum en plus ou en moins	
Dosage dans l'eau	5	pour cent
Dosage dans l'urine	10	—
Dosage dans le sang	10	—

et le liquide céphalo-rachidien.

Pour le dosage des phosphates et de la cholestérine, nous avons fait moins de mesures que pour les autres.

Le dosage des phosphates est simple et facile et donne des résultats exacts à 10 pour cent près.

Pour la cholestérine, le dosage est sujet à des causes d'erreur et les résultats que nous avons obtenus ne sont pas si constants jusqu'ici que ceux obtenus par la méthode colorimétrique.

Nous continuerons notre étude.

Pour les corps microcristallisés, les résultats sont satisfaisants en prenant les infimes précautions des microdosages.

Le dosage de l'urée donne des résultats comparables à ceux de la méthode volumétrique ; sa technique sans extraction selon la technique de Bang est rapide et suffisamment exacte pour la clinique.

Le dosage du calcium est beaucoup plus rapide que le dosage

chimique ; il permet de suivre des variations en plus ou en moins ; il est légèrement inférieur au point de vue exactitude à la méthode volumétrique de HIRTH.

De l'ensemble de notre travail de mesure opacimétrique, il résulte que les méthodes préconisées sont susceptibles d'être utiles en clinique. Leur pourcentage d'erreur est supérieur à ceux de la méthode pondérale, mais toujours égal ou inférieur à la méthode volumétrique.

Nous n'avons point étudié ici le dosage des albumines pour lesquelles MM. VERNES et BRICQ ont dressé une courbe d'absorption avec des appareils que nous avons employés ; cependant, un grand nombre de mesures personnelles nous font donner une erreur de 10 % en plus ou en moins à leur courbe, ce qui se rapproche du degré d'exactitude pour nos dosages non effectués en milieu chimiquement et physiquement définis.

Les techniques préconisées dans ce travail dans lesquelles le flocculum est pur chimiquement, et en suspension dans un milieu physiquement et chimiquement défini, méritent d'être employées par les biologistes.

Cette étude est le premier travail pratique sur des principes et des idées pleines d'intérêt pratique et scientifique.

Vu, le Président de la thèse,
J. BOUGAULT.

Vu : le Doyen,
RADAIS.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

- ABNEY (R. E.) and FESTING (R. E.). — Intensity of radiation through Turbid media. *Proc. of the Roy. Soc.*, 1886, 40, p. 378.
- ACHARD (Ch.). — Troubles des échanges nutritifs, t. 1, p. 369. Masson, Paris, 1926.
- AGLOT (T.). — Sur un appareil de dosage des précipités par une méthode optique. *C. R. Ac. Sc.*, 1893.
- AGLOT. — Imprimerie marseillaise. Marseille, 1893, 1894, 1895.
- ANDANT (A.). — Thèse Doct. ès sc. Paris, 1923.
- ARISZ (L.). — On the Tyndall Phenomenon in gelatin. Solutions. *Acad. of Amsterdam, Proc. of Sc.*, 1913, 16, 331, 418.
- ARRHENIUS (S.). — *Zeit. f. physikal chem.*, 1888, vol. 2, p. 115 ; 1892, vol. 10, p. 51.
- ARRHENIUS (S.) et BABANOWIC. — Cit. ap. Bechold. *Die Kolloïde in der Medizin*, etc...
- ARRHENIUS et MADSEN. — *Immun. chemie*. Leipzig, 1907, p. 16.
- AUGÉ. — *Bull. Soc. chem.*, 1921, vol. 29, p. 329 (bibliographie de la concentration ionique).
- AUGER (V.). — Principes de l'analyse chimique. Paris, collection Armand Colin, 1921, p. 166.
- AUGUSTE (Charles). — *C. R. Soc. Biol.*, 12 novembre 1923.
- AUGUSTE (Ch.) et AUGUSTE (S.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1925, 20 juillet, p. 639.
- AUGUSTE (Ch.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1922, t. 1, p. 1027.
- BACH (Z.). — *Journ. Chimie phys.*, 1920, vol. 18, p. 46.
- BANCELIN. — *Soc. Ch. phys.*, 1914, 22 avril.
- BARY. — *Journ. Ch. phys.*, 1912, vol. 10, p. 445.
- BAUDOUIN. — *C. R. Soc. Biol.* Dosage clinique de l'albumine par néphélométrie, 1920 et *Paris médical*, mai 1921.
- BAYLISS. — *Journ. of Pharm. and Exp. Ther.*, 1920.
— *Kolloïd Zeit.*, 1910, n° 6, p. 23.
- BÉNARD (H.) et LABORDE (F.). — Sur le dosage de l'albumine par les procédés dits néphélométriques. *C. R. Ac. Sc.*, 1923, 176, 98.

- BECKHOLD. — Die Kolloïde in der biologie und Medizin. Steinkoff, 1920.
- BECKHOLD et ZIÉGLER. — *Zeit. f. physik. ch.*, 1906, v. 56, p. 105.
— *Ann. des physik.*, 1906, v. 20 (4), p. 900.
- BERZELIUS. — *Journ. f. chim. und Physik.* 1820, v. 39, p. 38.
- BLOOR (W. R.). — *Journ. of biol.-chem.*, 1915, v. 31, p. 145 ; *Amer. chem. Soc.*, 1914.
— *J. of biol. chem.*, 1905, v. 31, p. 145 ; *Ann. Ch. Soc.*, 1914.
— *J. of biol. Chem.*, t. 17, p. 377, 1914.
- BLONDEL (A.). — Sur une méthode pour la mesure de la transparence atmosphérique. *C. R. Ac. Sc.*, 1920, 170, 93.
- BLOOR (W.). — Méthode néphélométrique pour la détermination de l'acide phosphorique et de ses composés contenus dans de petites quantités de sang. *Bull. Soc. Ch. biol.*, 1921, 3, 451 et *Bull. Soc. Ch.*, 1922 (4), 32, 529.
- BOUTARIC. — Contribution à l'optique des milieux troubles. Relation entre le pouvoir absorbant et la polarisation de la lumière diffusée. *Le Radium*, 1914, 11, 74. Thèse Doct. Faculté des Sc. Paris, 1918.
- BLOCK et RENWICK. — *The photographic Journal*, t. 61, 1916, p. 49.*
- BOURGOIS. — Dictionnaire de Wurtz, 2 suppl. Art. : Capillarité.
- BLUM, DELAVILLE et CAULAERT. — *C. R. Soc. biol.*, t. 93, p. 511, 1924.
- BOINOT. — Le métabolisme du calcium. Thèse Nancy.
- BOVIS (L.). — Thèse Doct. ès sc. Paris, 1928, 21.
- BOUTARIC. — *C. R. Ac. Sc.*, février 1928.
- BOUSQUET. — Recherches cryoscopiques. Besnard, Paris, 1899.
- BOUSQUET et ROGER. — *Revue de Médecine*, juin 1910.
- BURTON. — The physical proper, Ties of colloïdal, solution, 1916.
- CABANNES (G.). — Thèse Doct. ès sc. Paris, 1921. *C. R. Ac. Sc.*, le *Journ. de Phys.*, les *Ann. de Phys.* de 1914 à 1928.
- CABANNES (G.) et FAURE (P.). — Analyse spectroscopique de la lumière obtenue par diffusion moléculaire d'une radiation monochromatique au sein d'un fluide. *R. C. Ac. Sc.*, 1928, 186, 1533.
- CABANNES (J.) et GRANIER (J.). — Dépolarisation de la lumière diffusée par quelques substances organiques. *C. R. Ac. Sc.*, 1926, 182, 885.
- CARREZ. — *C. R. Soc. Biol.*, juillet 1927.
- CALCAR (N. P.). — Dialyse. Leiden, 1908.
- CARPENTIER. — *Traité du microscope*. Paris.
— *Electricien*, 1901, v. 21, p. 1.

- CHÉNEVEAU (C.) et AUDUBERT (R.). — Sur un néphélémètre. *Journ. de Phys.*, 1921 (6), 2, 19.
- Sur quelques propriétés optiques des milieux troubles. *Ann. de Phys.*, 1920 (9), 13, 134.
- CHÉNEVEAU et BOUSSU (R.). — Sur le dosage du calcium par la méthode opacimétrique. *C. R. Ac. Sc.*, 1923, 177, 1296.
- CHAUFFARD. — *C. R. Soc. Biol.*, 1910, v. 61, p. 481.
- CHAUFFARD et GOURAUD. — *Journ. Physiol.*, 1901, p. 461.
- CLARK et WELLS. — *Ann. ch. J.*, t. 35, p. 29.
- CHAULIAC (Guy de). — Faculté de Montpellier, XIV^e siècle.
- CHOUCROUN (M^{lle}). — Règle relative à la diffusion des électrolytes dans les gelées chargées. *C. R. Ac. Sc.*, 1928, 187, 296.
- CLAUDE et BALTHAZARD. — Cryoscopie des urines. Baillière, Paris, 1902.
- COTTON et MOUTON. — Les ultramicroscopes et les objets ultramicroscopiques. Paris, 1906 (Masson).
- CROVA. — *Anal. de chim. phys.*, 6^e série, t. 20, 1890, p. 480, t. 25, 1872.
- CONKLIN. — Microturbidimeter. *Journ. of the Optical Soc. of America*, 1925, 572.
- COMPTON (A. M.). — The Spectrum of Scattered X-rays. *Physic Review*, 1923 (2), 22, 409.
- DELASALLE (M.) et BELIN (M^{me} G.). — Dosage néphélométrique des petites quantités d'arsenic. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, 1, 91.
- DENIGÈS (G.). — *Précis de Chimie analytique*. Paris, Maloine, 1920, 670.
- DIÉNER. — *C. R. Ac. Sc.*, 1914, vol. 158, p. 1117.
- DITMAR. — Le caoutchouc et la Gutta-Percha, 1905, v. 3, p. 273.
- DOLD. — *Deutsche medizinische Wochenschrift*, janv. 1920.
- DOURIS. — Analyse du sang (traité). Imp. Vigot, Paris.
- DUCLAUX (J.). — Thèse de Sc. Paris, 1905.
- *Kolloid, Zeit.*, 1908, v. 3, p. 126.
- DUHOT et BOËZ (L.). — *Soc. méd. Nord*, 1914, 8 avril et 24 juillet
- DUHOT et GERNEZ (Ch.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1921, v. 34, p. 685.
- EINSTEIN (A.). — Theorie der Opaleszenz von homogenen Flüssigkeitsgemischen in der Nähe des Kritischen Zustandes. *Ann. der Physik.*, 1910 (4), 33, 1275.
- EHRENHAFT (Félix). — Das optische Verhalten der Metallkolloide und deren Teilchengrosse. *Ann. der Physik.*, 1903 (4), 11, 489.
- EINSTEIN. — *Ztschr. f. Electrochem*, 1907, v. 13, p. 41 ; ann. 1892, 1895 et 1897, 1905 exposé dans W. Meklemburg.
- Die experimen. Grudlegung der Atomistik., Jena, 1910.

EHRENHAFT. — *Drude's Ann.*, 1903, v. 1, p. 489.

— *Phys. Zeit.*, t. 5, 1904, p. 387.

FABRY et BUISSON. — *Journ. de Phys.*, 3 février 1919.

FABRY (Ch.). — Un phénomène remarquable découvert par M. Raman dans la diffusion de la lumière par les corps transparents. *Communication à la Soc. française de Phys.*, 1^{er} juin 1928.

— Leçons de photométrie professées à l'Institut d'Optique. Paris, éd. de la *Rev. d'Optique*, 1924, 41.

FABRY (Ch.) et BUISSON (H.). — Photomètre universel sans écran diffusant construit par M. Jobin. *Revue d'Optique*, 1922, 1, 1.

— Sur un microphotomètre destiné à la mesure de l'opacité des plaques photographiques. *C. R. Ac. Sc.*, 1913, 156, 389.

FÉRY (Ch.). — *C. R. A. S.*, décembre 1892.

FAUCHER. — Thèse Paris, 1911.

FOLIN et DENIS. — *J. of biol. Ch.*, t. 18, p. 268, 1914.

FOLIN et W. — *J. of Chemist.*, t. XXXVIII, 4919, p. 81.

FOSSE. — *Ann. de l'Institut Pasteur*, t. 30, n^o 12.

FOSSE, ROBYN et FRANÇOIS. — *C. R. A. Sc.*, 1914, t. CLIX, p. 367.

FOWLE (F. E.). — Avogadro's constant and atmospheric transparency. *Astrophys. Journ.*, 1914, 40, 435; et Fowle et Abbot, *Annals of the Astrophys. Observ. of the Smiths Inst.*, 1908, II, 1913, III.

FURTH (R.). — Spektralphotometrische Untersuchung der Opaletzen eines binären Flüssigkeitsgemisches, Sitzungsber., der K. Akad. der Wissensch. in Wien. math. naturw. Klasse, 1915 (D a), 124, 577.

GANS (R.). — Das Tyndallphänomen in Flüssigkeiten *Ztschr. für Physik*, 1923, 17, 353 et Ultramikroskopischer Studien, Methoden zur Formbestimmung subultramikroskopischer Teilchen. *Ann. der Physik*, 1920 (4), 62, 331.

— Ueber die Form ultramikroskopischer Goldteilchen. *Ann. der Physik*, 1912 (4), 37, 881; et Ueber die Form ultramikroskopischer silberteilchen. *Ann. der Physik*, 1915, (4) 47, 270, 880.

GANAUD. — Dosage colorimétrique de l'iode. *Bull. Soc. pharm. de Bordeaux*, 1896, 68.

GARNETT. — *Phil. trans* (A. 203, 1904, p. 205 et 385 et 1906, p. 237).

GARNIER. — *J. de Pharm. et ch.*, IX, p. 326, 1899.

GOURY. — Recherches photométriques sur les flammes colorées. *Ann. de ch. et de phys.*, 1879 (5), 18, 5.

GRAHAM (Otto). — *Lehrb. d. chemie*, 3^e éd., 1898, v. 1. p. 467.

GRAHAM (Th.). — *Phil. Trans.*, 1861, v. 151, p. 183.

- *Ann. ch. et phys.*, 1864, v. 3, p. 121-127.
- GRAHAM. — *Lieb. Ann.*, 1851, vol. 80, p. 197 et 1862, vol. 121, p. 1.
- *Phil. Trans.*, 1850, vol. 1, p. 1 et 2, p. 783-805.
- GREEN. — *Phil. Trans. of the R. Soc.*, 1897, p. 167.
- GRIMAUZ. — *C. R.*, 1883, p. 1540, 1884, v. 98, p. 105, 1424, 1485, 1578.
- GRIMMÉ. — Dosage du calcium en physiologie. Thèse Doct. ès sc., p. 36.
Fribourg, 1906.
- GRIMBERT. — *J. de Pharm. et Ch.*, t. 7, p. 105, 1913.
- *Précis de diagnostic*, p. 980.
- HALVERSON, MOHMER, MOHLER et BERGEIN. — *J. of Biol. chem.*, t. 32, p. 171.
- HALBAN (H.) and EISENBRAND (J.). — On the measurement of light absorption. *Proc. of the Roy. Soc.*, 1927 (A), 116, 153.
- HAMBURGER. — *Inter. Zeit. f. physik. chem. Biol.*, 1914, v. 1, p. 1.
- Osmotischer Druck und Ionenlehre, Bergmann, Wiesbaden, 1902-1904.
- *Zeit. f. physik. ch.*, 1904, v. 47, p. 495.
- HANDOVSKY. — *Kolloid. Zeitschr.*, 1910, v. 7, p. 183, 267.
- HARDY. — *Journ. of physiol.*, 1905, v. 33, p. 252.
- *Proc. Royal Soc.*, 1907, v. 79, p. 413.
- HENRI (V.). — Les colloïdes. *Revue génér. Sciences*, 1908.
- HUGOUNENCQ et MOREL. — *C. R. Soc. biol.*, 17 mai 1913, t. 24, p. 105 et 14 mars 1914.
- HORBACZEWSKI-BEZANÇON. — Format typhique de la goutte aiguë.
Journ. méd. fr.
- HIRSH et KLOTZ. — *C. R. Soc. biol.*, t. 88, p. 1153, 1923.
- ICOVESCO. — *Presse médicale* 1906.
- Etudes stalagmométriques. *Soc. Biol.*, 1910-1913.
- ISSOGLIT. — Ch. Abstract. (II) CXVI.
- JARDIN (F.) et ASTRUC (H.). — *Précis d'hydrologie et de minéralogie*.
Paris, A. Maloine, 1920, p. 103.
- JANSEN (W. H.). — *Zeit. f. physiol. chem.*, t. 101, p. 176, 1918.
- JONES et NYE. — *J. of biol. chem.*, juillet 1921.
- JONESCO, MATIN (Al) et M^{lle} VITUER (M.). — Sur le dosage du phosphore dans le sang. *Bull. Soc. Biol.*, t. XI, juin 1929, p. 776.
- KAMMERLING OMNÈS et W. H. KEESON. — Acad. d. sc. d'Amsterdam, 1908, p. 667.
- KEESON (W. U.). — Spektrophotometrische Untersuchung der Opaleszenz eines einkonsponentigen stoffes in der nähe des Kritischen Zustandes. *Ann. der Physik*, 1911 (4), 35, 591.

KEEN (B. A.) and PORTER (A. W.). — On the diffraction of light by particles comparable with wave-length. *Proc. of the Roy. Soc.*, 1914 (A.), 89, 370.

KLEINMANN (H.) — *Koll. zeit.*, 1920, v. 27, p. 236 ; *Bioch. zeit.*, 1919, vol. 99, facs. 16.

KLEINMANN. — Nephelometer (Amélioration et modification). *Biochen. Ztschr.*, 1923, 137, 140.

KING (L. Vessot). — On the Scattering and absorption of light in gaseous media, with applications to the intensity of sky radiation. *Phil. trans. of the sect. of sc.*, 1912 (A), 212, 375.

KLING (A.). — Thèse Paris, 1905 (données numériques sur les indices réfractométriques).

KOBER (P. A.). — *Journ. biolog. ch.*, 1912, 1913, v. 13, p. 485.

KOBER et EGERET. — *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1915, n° 37, p. 2373.

KOLL (Z.). — 1916, 1922. Voir Guthier et ses élèves, coll.

KRAMER et TISDALL. — *J. of biol. chem.*, août 1922.

KUGELMANS (J. Newton). — Un nouvel appareil : le néphéloctémètre. *C. R. Ac. Sc.*, 1922, 175, 343.

LANGEOIN (P.). — Les idées modernes sur la matière (Conférences de la Soc. franç. de physique). Les grains d'électricité, 1913, 97.

LAMB (A.), CARLTON et MELDRUM (W.). — *Ann. Ch. J.*, t. 33, 34, 35.

LAMBERT, VLÈS et DE WATTEVILLE. — Sur un opacimètre destiné aux dosages bactériens. *C. R. Ac. Sc.*, 1919, 168, 797.

LAUDAT. — *J. phys. et ch.*, 1927, t. 1, p. 108.

LÉGIER (A.). — Thèse Doct. Univers. (Pharmacie.) Paris, 1924.

LEVITES. — *Koll. Ztschr.*, 1907, v. 2, p. 210.

LINDER et PICTON. — *Trans. chem. Soc. London*, 1905, p. 344 et 1909.

LOEB (J.). — *J. de chim. phys.*, 1920, v. 18, p. 283.

LORD RAYLEIGH. — On the transmission of light through an atmosphere containing small particles in suspension. *Phil. mag.*, 1899 (5), 47, 375 et *Scientific Papers*, vol. 1, 87, 96, 104, 518, vol. IV, 39.

LORENTZ (H.-A.). — On the Scattering of light by molecules. Acad. of Amsterdam, *Proc. of the Sect. of Sc.*, 1910, 13, 92.

LYMANN. — *J. of biol. chem.*, t. 29, p. 169, 1917.

MALYS (Jahresber). — *Uber d. Fortsch d. chem.*, 1897.

MARTIN (W. U.) and LEHRMAN (S.). — The Scattering of light by dust-free liquids. *Journ. of phys. Chemist.*, 1922, 26, 75.

MAQUENNE. — *Bull. Soc. Chim.*, XIX, p. 926, 1898.

MARTINET. — Pression artérielle et viscosité sanguine. Paris, 1912.

- MAXWELL-GARNETT (G.). — Colours in metal glasses, in metallic films.
Phil. Trans. of the Roy. Soc., 1904 (A), 203, 385 et colours in metallic solution. *Phil. trans. of the Roy. Soc.*, 1906 (A.), 205, 237.
- MECKLENBURG (W.) et VALENTINIER (S.). — *Zeit. Instrumentenkunde*, 1914, v. 34, p. 209.
— *Kolloid Zeit.*, 1914, v. 14, p. 172.
— *Kolloid Zeit.*, 1915, v. 16, p. 97.
— *Naturwissenschaften*, 1915, n° 25.
- MESTREZAT (M.) et JANET (Marthe). — *J. de Pharmacie et Ch.*, t. 22, novembre 1920, p. 365.
- MIE (G.). — Beiträge zur Optik trüben medien speciell Kolloidaler Metallösungen. *Ann. der Physik*, 1908, 25, 377 à 446.
— *Microchemie*, 1^{er} trimestre 1930. Bibliographie.
- MILDER et STASS. — *Ann. Ch. J.*, t. 31, p. 235.
- MOLISH. — *Bot. Zeit.*, 1908.
- MUELLER. — Bibliogr. d. Kolloïde bis zum Jahre, 1904.
— *Allg. chemie der Kolloïde*. Leipzig, 1907, p. 47.
— *Münch. med. Woch.*, p. 350, 1897.
- MUELLER (A.). — Das optische Verhalten der Kolloïdalen metalle.
Ann. der Physik, 1907 (4), 24, 1.
- NICLOUX et WELTER. — *C. R. Soc. biol.*, 1922, t. 46, p. 161.
- ORNSTEIN (L.-S.). and ZERNIKE (F.). — Accidental deviation of density and opalescence at the critical point of a single substance, Academy of Amsterdam. *Proc. of Sc.*, 1914, 17, 793.
- OSTWALD (W.). — *Grundr. d. allg. chem.*, 1899, p. 385.
— *Koll. Zeit.*, 1907, v. 1, p. 333.
— *Koll. Zeit.*, 1910, v. 7, p. 132.
— *Lehrb. d. allg. chemie*, 1903, p. 632.
— *Zeit. f. Physik. ch.*, 1888, v. 2, p. 563.
— *Kolloid Zeit.*, 1920, v. 26, p. 69.
— *Koll. chem. Beihefte*, 1919, v. 10, p. 179.
- OSTWALD (A.). — *Zeit. f. exp. Path. et Ther.*, 1910, v. 8, p. 226.
- PAULÉ et HOFNIFISTER. — Kolloidstudien un Eiweiss. Dresden.
- PERRIN (G.). — Congrès de Physique, 1900, p. 531 (Osmose).
— *Journ. de Chimiephysique*, 1904, v. 2, 1905 et v. 3, p. 76.
— *Ann. de phys. et chim.*, septembre 1909.
- PERTNER. — *C. R. Ac. Sc. de Vienne*, t. LXXIII, 1901.
- PEYRE. — *Soc. biol.*, 1921.
- PIPERING. — *Kolloidzeiseht*, 1920, v. 7, p. 6.

- POUGEL et CHOUCAT. — *Bull. Soc. Chim.*, 1909, v. 5, p. 104 et 1911, v. 9, p. 649.
- RAMAN (C. V.). — A new radiation. *Indian Journ. of Physies*, 1928, 2, 3 et RAMAN (C. V.) and KRISHNAN (K. S.), A theory of light Scattering in liquids. *Phil. Mag.*, 1928, 5, 498.
- On the molecular Scattering of lighth in water and the colour of the sea. *Proc. of the Roy. Soc.*, 1922 (A), 101, 64.
- RAMAN (C. V.) and RAMANATHAN (K. R.). — The molecular Scattering of light in liquid mixtures. *Phil. Mag.*, 1923 (1), 45, 213.
- RAMANATHAN (K. R.). — The molecular Scattering of light in vapours and in liquids and its relation to the opalescence observed in the critical state. *Proc. of the Roy. Soc.*, 1923 (A), 102, 151.
- RAQUET. — *Ann. de falsification*, 1927, p. 580. *J. phys. et chim.*, 1928, t. 2, p. 489.
- RICHARDS. — *Ann. Ch. J.*, t. 35, p. 511, 1906.
- RICHARDS et WELLS. — *Ann. chem. J.*, vol. 31, p. 235, 1904.
- RIMATTEI (F.). — L'eau pure, sa préparation, son identification et sa conservation. *Rev. méd. de France et des colonies*. Marseille, 1927, 1, 1. Thèse Facult. de pharm. Paris.
- ROCARD (Y.). — Thèse Doct. ès sc. Paris, 1928 et les nouvelles radiations diffusées. *C. R. Ac. Sc.*, 1928, 186, 1107.
- Thèse dipl. Etudes supérieures. Paris, 1922.
- RONA (P.) et KLEINMANN (H.). — Une méthode pour le dosage néphé-lométrique des plus petites quantités d'albumine. *Biochem. Ztschr.*, 1923, 140, 461 et *Bull. Soc. Chim.*, 1924 (4), 36, 1835.
- ROUSSEAU. — Viscosité et le diabète. Thèse de Paris, 1920.
- SACEHI et GÉORGI. — *Méd. Klinik.*, n° 33, 1918.
- SCHEITLIN. — Thèse Zurich, 1909.
- SEQUER, 1752; SEQUER (Cg.) in CHWOLSON. — *Traité de Physique*. Paris, 1907, v. 1, p. 594.
- SHEPART et ELLIOT. — *J. of the Ann. Ch. Soc.*, t. 43, mars 1921, p. 531-538.
- SIEDENTOFF (H.) und ZSIGMONDY (R.). — Ueber Sichtbarmachung und Grössenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen mit besonderer Anwendung auf Goldrübengläser. *Ann. der Physik*, 1903 (4), 10, 1.
- SMOLUCHOWSKI. — Boltzmann. Festschrift, Leipzig, 1904, p. 626. *Zeit. f. Physik. Ch.*, 1917, vol. 92, p. 129.
- SMOLUCHOWSKI (M. M.). — Théorie cinétique de l'opalescence des gaz à l'état critique et de certains phénomènes corrélatifs. *Bull.*

- internat. de l'Acad. des Sc. de Cracovie, Cl. des Sc. math. et nat.*, 1909, 1057.
- STAMM (A. G.) and SWEDBERG (The). — The use of Scattered light in the determination of the distribution of sizes of particles in emulsions. *The Journ. of the Americ. Chem. soc.*, 1925, 47, 1582.
- STENBING. — Ueber die optischen Eigenschaften kolloidalen Goldlösungen. *Ann. der physik*, 1908 (4), 26, 329.
- STINTZING. — *Koll. bioch.*, 1914, v. 6, p. 230.
- STOKES (G. G.). — On the theories of the internal friction of fluids in motion and on the equilibrium and motion of elastic solids. *Trans. of the Cambridge philos. Soc.*, 1845, 3, 28 et *Stoke's papers*. Cambridge University press, 1901, 1, 175.
- STRUTT (R. G.). — Scattering of light by dust free air, with artificial reproduction of the blue sky. *Proc. of the Roy. Soc. (A)*, 1918, 94, 453.
- TAILLANDIER (M.). — Dosages et microdosages optiques dans les liquides biologiques au moyen du photomètre Vernes, Bricq, Yvon. *C. R. Soc. biol.*, 26 juillet 1927, t. XCVII, p. 557 et *C. R. Soc. biol.*, 23 juillet 1927, t. XCVII, p. 706.
- Technique de précipitation colloïdale des constituants des liquides biologiques en vue de leurs microdosages optiques. *J. de Pharm. et Ch.*, 1927, 8^e série, t. 6, p. 465.
- TARDY (L.). — Le remplacement de l'œil par la cellule photoélectrique sur les spectrophomètres visuels. *Rev. d'Optique*, 1928, 7, 189.
- TSCHIEMBER (Cl.). — La calcémie dans les états pathologiques, p. 11. Thèse doct. méd. Strasbourg, 1924.
- TSWETT. — *Zeit. f. physik.*, t. 36, p. 4 et 450.
- URBAIN. — Etudes des complexes.
- VERNES (Dr Arthur). — Publication de l'Inst. prophylactique de Paris, fasc. 1 à 6, Paris, Maloine, 1922 à 1928.
- VERNES (A.) et BRICQ. — Mesures pondérale de la floculation par la photométrie. Publications de l'Inst. prophylact. de Paris, 1922, 1, 39.
- VERNES, BRICQ, YVON. — Photomètre d'absorption et de diffusion de Vernes, Bricq et Yvon. Publications de l'Institut prophylactique de Paris, 1923, 2, 70.
- VERNES (Dr A.). — L'exploration sérologique de la syphilis. Publications de l'Inst. prophylactique de Paris, 1923, 2, 9.

VERNES. — *Soc. biol.*, 1918, février.

VLÈS (Fréd.). — Sur quelques propriétés optiques des émulsions bactériennes. *C. R. Ac. Sc.*, 1919, 168, 575.

— Sur la transmission des émulsions de bactéries et d'hématies. *C. R. Ac. Sc.*, 1919, 168, 794.

WALPOLE. — *Bioch. Journ.*, 1910, v. 5, 1884, v. 14, p. 207, p. 427.

WEIL (M. P.). — L'uricémie témoin de l'insuffisance rénale. *C. R. Soc. biol.*, novembre 1921, p. 216.

WEILL (M. P.), GUILLAUMIN (Ch. O.), WEISSMANN-NETTER. — *C. R. S. biol.*, t. 88, p. 732, 1923.

WERNER. — La chimie des complexes.

ZERNICKE (F.). — Dissertation inaugurale. Amsterdam, 1915 et the clustering tendency of the molecules in the critical stade and the extinction of lighth caused thereby Academy of Amsterdam. *Proc. of Sc.*, 1916, 18, 1520.

ZSIGMONDY (R.). — *Kolloidchemie und Ustramikroskopie*. Leipzig, 1920, 3^e éd.

— *Physik Zeit.*, 1913, v. 14, p. 975.

— *Zeit. f. Elektrochem*, 1898, v. 4, p. 546.

— *Liebig's Ann.*, 1898, v. 301, p. 29.

— *Zeit. f. physik Ch.*, 1917, vol. 97, p. 600.

ZSIGMONDY et BACHMANN. — *Koll. Zeit.*, 1914, v. 14, p. 281.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION ET DIVISION DE L'OUVRAGE	5
CHAPITRE PREMIER. — Exposé historique des méthodes de mesure optique des milieux troubles	9
CHAPITRE II. — Lois fondamentales des milieux troubles	21
Lois fondamentales des milieux troubles.....	21
Principes généraux de construction pour les appareils destinés aux mesures optiques par opacimétrie	42
CHAPITRE III. — Statique des colloïdes. Technique de manipulation des suspensions colloïdales.....	69
CHAPITRE IV. — Recherches expérimentales sur les techniques de précipitation à grains fins pour les dosages et microdosages optiques par opacimétrie	95
1 ^o <i>Précipités amorphes</i> :	
Dosage des chlorures	98
Dosage de l'acide urique	123
Dosage des phosphores	152
Dosage de l'acétone	158
Dosage des sucres réducteurs	175
Dosage du cholestérol	194
2 ^o <i>Précipités cristallins</i> :	
Dosage du calcium.....	202
Dosage de l'urée	222
CHAPITRE V. — Résultats. Comparaison avec les méthodes volumétriques et gravimétriques	243
BIBLIOGRAPHIE	246

